

Valorização de Subprodutos numa Indústria de Hortofrutícolas - Desenvolvimento de Produtos de Elevado Valor Acrescentado

Ângela Beatriz Almeida Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadores: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu

Júri:

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu, Investigadora auxiliar, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P

Doutora Elsa Margarida Nunes Leal Gonçalves, Investigadora auxiliar, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P

Lisboa, 2019

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar só foi possível devido à colaboração, ao apoio e incentivo de inúmeras pessoas, às quais apresento o meu profundo agradecimento:

À minha orientadora, Professora Doutora Margarida Moldão, que expresso o meu profundo agradecimento pela oportunidade, orientação e apoio incondicional. Agradeço também a confiança que depositou em mim, desde o início, como também o sentido de responsabilidade que me deu na elaboração desta dissertação.

À minha orientadora, Doutora Marta Abreu, pela sua infinita disponibilidade, profissionalismo e sentido critico, mas acima de tudo um especial agradecimento pela sua paciência, força, motivação e apoio incansável, que sem ela, a realização desta dissertação não seria possível.

À Doutora Carla Alegria, pela sua inteira disponibilidade e esclarecimento de dúvidas, bem como o seu incentivo e conhecimentos transmitidos.

À minha colega de laboratório, Isa Raposo, pela ajuda, entusiasmo e boa disposição sempre presente, sem ela, esta experiência não teria sido a mesma.

Às técnicas da Unidade de Microbiologia Alimentar UTI do INIAV, Cláudia Correia e Maria do Carmo, em particular à responsável da unidade, Dra. Cristina Aleixo, pela colaboração na realização das análises microbiológicas.

À responsável da Unidade de Química Alimentar, pela colaboração e realização da análise composicional de minerais.

À empresa Frubaça - Cooperativa De Hortofruticultores Crl, pela total disponibilidade de materiais e meios ao desenvolvimento do trabalho.

A toda a minha família, amigos e namorado, um enorme obrigada por todo o apoio e compreensão. Espero futuramente, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que me ofereceram. Não existem palavras que possam expressar todo o meu agradecimento.

A todos os que não foram mencionados, com a certeza de que não foram esquecidos, o meu

Muito Obrigada

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE

A análise dos montantes de 4 categorias de subprodutos gerados numa indústria de hortofrutícolas (HF), contabilizou, no conjunto, 180 toneladas por mês. As categorias Maçã (id: A; 6 t/mês), Maçã/Cenoura (Id: B; 7 t/mês), Laranja (Id: C; 39 t/mês), e Outros (Id: D; 128 t/mês), integram na sua constituição partes de diversos HF provenientes do fabrico de sumos cuja designação reporta à(s) matéria(s)-primas(s) predominantes na formulação, com exceção da última que inclui uma diversidade muito heterogénea. A caracterização composicional, revelou para todas os casos, teores de humidade elevados (ca 82%), carácter ácido ($\text{pH} < 7$), sólidos solúveis na gama de 6,0° a 8,5° Brix, e contagens microbiológicas de $\leq 6 \text{ Log UFC / g}$ para microrganismos totais e de $\leq 5 \text{ Log UFC / g}$ para bolores e leveduras. Estes resultados determinam um grau de perecibilidade elevado. No entanto, a ausência de patogénicos, garante as condições de segurança necessárias à respetiva valorização alimentar. A composição fitoquímica revelou-se interessante do ponto de vista bioativo com valores de capacidade antioxidante (AOx) de 80 a 90 g eq. trolox.100 g⁻¹, atribuída quer a compostos fenólicos (CFT) quer a carotenoides. Na categoria A predominaram os compostos fenólicos (56 mg eq. ácido galico.100 g⁻¹) e, nas categorias B e C, para além destes (59 e 82, mg eq. ácido galico.100 g⁻¹, respetivamente) foram quantificados carotenoides (11 mg β -caroteno.100 g⁻¹). No estudo de viabilidade do subproduto A enquanto matriz para extração fenólica foram otimizadas as condições de extração (máximo de 50 mg eq. ácido galico.100 g⁻¹) pelo método sólido-líquido (etanol a 50%, 20 minutos sob agitação magnética). Acresce que este subproduto liofilizado (a_w de 0,5) demonstrou potencialidades para utilização como ingrediente alimentar, tendo contabilizado elevado potencial bioativo (AOx - 182 g eq. trolox.100 g⁻¹ e, CFT - 170 mg eq. ácido galico.100 g⁻¹) e elevado grau de doçura (39 °Brix).

Palavras-chave: Compostos bioativos, hortofrutícolas, subprodutos, valorização

ABSTRACT AND KEYWORDS

The analysis of the generated amounts of 4 by-products categories of a fruit and vegetable industry (HF) totaled 180 t/month. The categories Apple (ID: A; 6 t / month), Apple/Carrot (ID: B; 7 t / month), Orange (ID: C; 39 t / month), and Other (ID: D; 128 t / month), are constituted by different parts of several fruit and vegetables from juice manufacture whose designation refers to the predominant raw material (s) in the formulation, except the last one which includes a very heterogeneous diversity. Compositional characterization revealed for all cases high moisture contents (ca 82%), acid character (pH <7), soluble solids in the range of 6.0° to 8.5° Brix, and microbiological counts of Log 6 Log UFC / g for total microorganisms and Log 5 Log UFC / g for mold and yeast. These results determine a high rate of perishability. However, the absence of pathogens ensures the necessary safety conditions for their food valorization. The phytochemical composition was interesting from the bioactive point of view with antioxidant capacity (AOx) values from 80 to 90 g eq. trolox.100 g⁻¹. Phenolic compounds predominated in category A (56 mg eq. Galic acid.100 g⁻¹) and in categories B and C, in addition to these (59 and 82, mg eq. galic acid.100 g⁻¹, respectively), carotenoids were quantified (11 mg β-carotene.100 g⁻¹). In the viability study of byproduct A as a matrix for phenolic extraction, the extraction conditions (maximum 50 mg eq. Galic acid.100 g⁻¹) were optimized by the solid-liquid method (50% ethanol, 20 minutes under magnetic agitation). Adding this lyophilized byproduct (a_w 0.5) has shown potential for use as a food ingredient, having considered potential bioactive potential (AOx - 182 g eq. Trolox.100 g⁻¹ e, CFT - 170 mg eq. Galic acid.100 g⁻¹) and high degree of sweetness (39 °Brix).

Key words: Byproducts, Fruit and vegetables, phenolic compound, valorization

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO E PALAVRAS-CHAVE	3
ABSTRACT AND KEYWORDS	4
ÍNDICE	5
ÍNDICE DE TABELAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
CONTEXTUALIZAÇÃO	12
I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1 SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA HORTOFRUTÍCOLA	14
1.1 Enquadramento geral e definição	14
1.2 Vias de valorização tradicionais	15
2 COMPOSIÇÃO BIOATIVA DE HORTOFRUTÍCOLAS	16
2.1 Compostos fenólicos	17
2.2 Carotenoides	18
2.3 Vitaminas	20
2.4 Fibras	22
2.5 Minerais	22
3 VIAS DE VALORIZAÇÃO DE VALOR ACRESCENTADO	23
3.1 Recuperação de fitoquímicos bioativos	25
3.2 Ingrediente alimentar	26
3.3 Valorização energética	27
4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE INTERESSE	28
4.1 Métodos convencionais	28
4.1.1 Extração sólido-líquido	28
4.1.2 Extração por Soxhlet	29
4.1.3 Maceração	29
4.1.4 Hidrodestilação	30
4.2 Métodos não convencionais	30

4.2.1	Extração assistida por ultrassons	30
4.2.2	Extração com líquido pressurizado.....	31
4.2.3	Extração com água supercrítica	31
4.2.4	Extração assistida por micro-ondas.....	32
4.2.5	Extração com fluidos supercríticos	33
4.2.6	Extração através de enzimas	33
4.2.7	Extração por campo de pulsos elétricos	34
4.2.8	Métodos convencionas de extração versus métodos não convencionais	34
II	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5	Determinações físico-química e bioquímicas	37
5.1	Teor de sólidos solúveis.....	37
5.2	Humidade.....	37
5.3	Atividade de água	37
5.4	pH.....	37
5.5	Acidez	38
5.6	Teor de minerais	38
5.7	Capacidade antioxidante.....	38
5.8	Compostos fenólicos.....	39
5.9	Carotenoides.....	40
6	Determinações microbiológicas	41
6.1	Microrganismos a 30°C	41
6.2	Bolores e leveduras	41
6.3	Bactérias lácticas	42
6.4	Bactérias patogénicas.....	42
6.5	Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	42
7	Métodos estatísticos	42
8	Procedimentos de preparação das amostras de subprodutos.....	43
III	TRABALHO EXPERIMENTAL.....	43
9	FASE I: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS SUBPRODUTOS NA UNIDADE INDUSTRIAL	44

9.1	Caracterização geral do processo produtivo	44
9.2	Quantificação dos subprodutos na unidade industrial	47
9.3	Considerações intercalares.....	51
10	FASE II: CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL DAS CATEGORIAS DE SUBPRODUTOS	51
10.1	pH, TSS, cidez Titulável e Teor de Humidade,.....	51
10.2	Atividade antioxidante, Conteúdo Fenólico Total e Conteúdo em Carotenoides Total	53
10.3	Análise multivariada dos resultados.....	56
10.4	Avaliação da contaminação microbiológica.....	59
11	FASE III: VALORIZAÇÃO DA CATEGORIA DE SUBPRODUTOS DE MAÇÃ	64
11.1	Otimização das condições de extração de compostos fenólicos.....	64
11.1.1	Delineamento experimental.....	64
11.1.2	Estudo do efeito da agitação e da temperatura na extração.....	67
11.1.3	Avaliação da estabilidade de compostos fenólicos no subproduto de maçã.....	68
11.2	Avaliação do potencial de utilização do subproduto de maçã liofilizado	70
11.3	Considerações intercalares.....	72
12	CONCLUSÕES FINAIS	73
13	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas classes de compostos fenólicos (Adaptado de: Aguiar, 2017; Harborne & Baxter, 1982).....	17
Tabela 2 - Estrutura química das diferentes pigmentos de carotenoides e as suas respectivas fontes naturais (Adaptado de Landrier et al., 2012; Silva, 2016).....	19
Tabela 3 – Estudos realizados com a incorporação de compostos fenólicos ou fibras alimentares resultantes de subprodutos de indústrias de hortofrutícolas em diferentes alimentos (Adaptado de Iriondo-DeHond <i>et al.</i> , 2018)	25
Tabela 4 – Diversos estudos no âmbito de desenvolvimento de produtos de panificação com a incorporação de subprodutos de diferentes frutos.	26
Tabela 5 - Comparação entre as técnicas de extração convencionais e não convencionais (Adaptado de Coelho, 2013).....	34
Tabela 6 – Exemplo de métodos de extração de compostos bioativo utilizando matizes de subprodutos da indústria hortofrutícola.....	36
Tabela 7 - Identificação das categorias dos subprodutos e do composto bioativo preponderante.....	50
Tabela 8 - Valores médios (\pm DP) dos parâmetros de pH, TSS, AT e TH, nas diferentes categorias de subprodutos (A, B e C).....	52
Tabela 9 - Contagem de Coliformes, E.coli e bactérias patogénicas (Log UFC / g) nas diferentes categorias de subprodutos [A (Maçã); B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês .62	
Tabela 10 - Valores médios dos parâmetros de pH, TSS, AT, Aox, CFT e CCT nas diferentes categorias de subprodutos (A, B e C).....	63
Tabela 11 - Matriz codificada e decodificada para as variáveis estudadas.....	65
Tabela 12 – Modelos para o CFT e TSS.....	66
Tabela 13 – Valores médios (\pm DP) dos relativamente ao CFT, AOx, TSS, aw e Mic. 30 °C na amostra de maçã liofilizada.	70
Tabela 14 - Valores médios (\pm DP) do teor mineral relativo à amostra A, expressos em mg por 100 g de fruto (peso seco).....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Vegetais e Frutos como fonte alimentar de vitaminas (Adaptado de Associação Portuguesa de Nutrição, 2017)	21
Figura 2 - Presença de Fibras em diferentes frutos (com casca) por 100 g (edível) (Adaptado de Associação Portuguesa de Nutrição, 2017)	22
Figura 3 – Exemplo de minerais encontrados em maior ou menor expressão em diferentes frutos (Adaptado de Associação Portuguesa de Nutrição, 2017).	23
Figura 4 – Esquema ilustrado de uma extração Soxhlet (Cunha, 2011)	29
Figura 5 - Esquema ilustrado da técnica de extração por hidrodestilação (Cardoso, 2017; Samadi <i>et al.</i> , 2017).	30
Figura 6 – Ilustração simplificada do método utilizado para a caracterização da capacidade antioxidante.	39
Figura 7 – Ilustração simplificada do método utilizado para a caracterização do conteúdo de compostos fenólicos totais.	40
Figura 8 - Ilustração simplificada do método utilizado para a caracterização do conteúdo de carotenoides totais.	41
Figura 9 – Diagrama geral de processamento do sumo. *Depende da matéria-prima a ser utilizada.	45
Figura 10 – Palotes para acondicionamento dos resíduos por categorias.	48
Figura 11 – Estimativa de quantitativos subprodutos gerados, em toneladas, por categoria e por mês.	49
Figura 12 – Aspeto geral das diferentes categorias de subprodutos (A, B e C).	50
Figura 13 - Conteúdo fenólico total (mg EAG.100 g ⁻¹) avaliado nas diferentes categorias de subprodutos [Categoria A (Maçã); Categoria B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).	54
Figura 14 - Conteúdo carotenoides total (mg β -caroteno.100 g ⁻¹) avaliado nas diferentes categorias de subprodutos [Categoria A (Maçã); Categoria B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).	55
Figura 15 – Capacidade antioxidante relativa à fração hidrofílica (g ET.100 g ⁻¹) avaliado nas diferentes categorias de subprodutos [Categoria A (Maçã); Categoria B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).	56

Figura 16 – Dendograma das 5 variáveis (CCT, CFT, AOx, TA e TSS) testadas nas amostras de subprodutos (A, B e C).....	57
Figura 17 - Projeção espacial da ordenação dos vetores dos atributos analisados nas amostras (A, B e C), no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.....	58
Figura 18 - Projeção espacial das categorias (A, B e C) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.....	59
Figura 19 – Contagem de microrganismos a 30°C (Log UFC / g) nas diferentes categorias de subprodutos [A (Maçã); B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).....	60
Figura 20 – Contagem de bolores e leveduras (Log UFC / g) nas diferentes categorias de subprodutos [A (Maçã); B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).....	61
Figura 21 - Contagem microbiológica de bactérias lácticas (Log UFC / g) nas diferentes categorias de subprodutos [A (Maçã); B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).....	62
Figura 22 - Superfície de resposta em função da proporção de etanol (X1) (%) e do tempo de extração (X2) (min). (A) Teor de compostos fenólicos (Y1) (mg EAG.100 g ⁻¹); (B) Teor de sólidos solúveis (Y ₁) (°Brix).....	67
Figura 23 – Efeitos do modo de extração (agitação magnética vs. ultrassons), tipo solvente (etanol 50% vs. água) e temperatura de acondicionamento (5°C e 25°C) no processo de extração fenólica de subproduto de maçã.	68
Figura 24 - Avaliação da estabilidade do teor fenólico em amostras de subproduto de maçã: modo de extração , ao longo de 5 dias em duas condições distintas (5°C e temperatura ambiente).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AOx	Atividade antioxidante	EFS	Extração com fluidos supercríticos
AT	Acidez Titulável	ELP	Extração com líquido pressurizado
a _w	Atividade de água	ET	Equivalentes de Trolox
ca	cerca	HF	Hortofrutícolas
CCT	Teor de carotenoides totais	INIAV	Instituto Nacional de Investigação agrária e veterinária
CFT	Compostos fenólicos totais	MRS	Man, Rogosa and Sharpe Agar
CH ₄	Metano	PCA	Análise de componentes principais
CO ₂	Dióxido de carbono	PAL	Enzima fenil alanina amônia liase
DRBC	Agar Dichloran Rose Bengal Chlortetracycline	TH	Teor de humidade
EAE	Extração assistida com enzimas	TSS	Teor de sólidos solúveis
EAG	Equivalente de ácido gálico	VRBG	Violet, Red Bile Glucose Agar
EAM	Extração assistida por micro-ondas		
EAP	Extração assistida com campo de pulsos elétricos		
EAS	Extração com água supercrítica		
EAU	Extração assistida por ultrassons		

CONTEXTUALIZAÇÃO

No sector agroindustrial a valorização de subprodutos representa uma tendência de interesse crescente por parte das indústrias de transformação alimentar, uma vez que neste são geradas grandes quantidades de desperdício, refugo, subprodutos e resíduos. Esta situação assume uma importância crucial sobretudo a indústria de hortofrutícolas por se tratar de um sector com elevado peso na economia (INE, 2010). Nesta atividade, o material vegetal descartado inclui uma diversidade de matéria vegetal, nomeadamente cascas, sementes, talos, entre outras partes não edíveis. Estes materiais caracterizam-se por ser muito perecíveis em virtude dos elevados teores em matéria orgânica, água (70-90%) e contaminação microbiológica (Bouallagui *et al.*, 2005).

O aproveitamento deste material vegetal através de abordagens tradicionais como a utilização na alimentação animal, a incineração e a compostagem, nem sempre demonstra eficiência podendo muitas vezes acarretar custos para as empresas. Nos últimos anos têm sido estudadas e testadas vias alternativas para a utilização destes produtos, acrescentando-lhes valor e tornando possível reduzir os custos associados ao respetivo tratamento, armazenamento e transporte. A valorização destes materiais insere-se igualmente na aposta de promoção do desenvolvimento sustentável e na proteção ambiental (Baeta, 2014).

A composição química da matéria vegetal descartada pelas industria de hortofrutícolas inclui quantidades elevadas de compostos antioxidantes naturais e/ou de outros compostos de interesse biológico e/ou sensorial, tais como compostos fenólicos, pigmentos, fibras, vitaminas e sais minerais. Em consequência estes subprodutos podem constituir matrizes promissoras e baratas para a extração de fitoquímicos de utilização diversificada, quer na própria indústria alimentar quer nouro tipo de indústrias, como a farmacêutica e a cosmética. Com este objetivo, têm sido desenvolvidos e otimizados métodos para a extração destes compostos a partir destas matrizes. A necessidade de aumentar a eficiência de extração e evitar a utilização de solventes poluentes, têm sido testados, a par das metodologias convencionais, nova abordagens designadamente pela combinação de tratamentos.

Por outro lado, setor agroindustrial e a comunidade científica têm, em conjunto, desenvolvido vários estudos com o objetivo de reaproveitar estes materiais na ótica de considera-los como ingredientes coprodutos) para a formulação de alimentos funcionais. Estas vias de reutilização dos subprodutos contribui igualmente para lhes acrescentar valor, criar novos nichos de mercado, contribuindo assim para a diversificação de dietas saudáveis promotoras da saúde e bem-estar humanos (Valente, 2015).

Por outro lado, estas estratégias de valorização de subprodutos, no desenvolvimento de alimentos saudáveis, no combate ao desperdício alimentar e na redução do impacto ambiental cumprem as principais motivações do consumidor atual (Falguera *et al.*, 2012).

Uma das limitações ao desenvolvimento de sistemas de recuperação / valorização deste tipo subprodutos na indústria de hortofrutícolas, prende-se ao fato das pequenas empresas com diferentes níveis de organização não possuírem escala suficiente para implementar estes processos e/ou gerarem quantidades muito variáveis, dependentes da sazonalidade. Este constrangimento poderá de ser ultrapassado pela recolha integrada de subprodutos de várias unidades industriais cujos subprodutos devidamente caracterizados, apresentem composição semelhante ou complementar (Valente, 2015).

Este estudo, no âmbito do projeto *ProEnergy* (PDR2020, 2017 – 2021), teve por objetivos quantificar os volumes gerados e caracterizar composicionalmente diferentes categorias de subprodutos gerados numa indústria transformadora de hortofrutícolas, e avaliar, para uma das categorias, a respetiva valorização enquanto matriz para a extração de compostos fenólicos e/ou utilização como ingrediente alimentar.



I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA HORTOFRUTÍCOLA

1.1 Enquadramento geral e definição

Segundo a Comissão Brundtland (WCED, 1987) o desenvolvimento para ser considerado sustentável deve satisfazer as necessidades da geração atual sem comprometer as necessidades das gerações futuras. A procura por um desenvolvimento sustentável que garanta a existência de recursos para o desenvolvimento de gerações futuras tem sido assim a motivação dominante no contexto da produção industrial para a recuperação de materiais subaproveitados ou até desvalorizados (Bond & Morrison-saunders, 2011).

Atualmente, a valorização dos “resíduos” agroindustriais é uma das principais estratégias do novo plano de financiamento da Comunidade Europeia, no programa Portugal 2020. Este novo financiamento tem como principais objetivos a promoção e criação de oportunidades para o desenvolvimento de um setor agroindustrial sustentável e competitivo (Pintado & Teixeira, 2015).

De acordo com o Regulamento 442/1975/CEE (posteriormente revogado pela Directiva 2006/12/CE que viria a ser revogada também pela Directiva 2008/98/CE), a designação de “resíduo alimentar” corresponde a resíduos de carga orgânica elevada, os quais são geralmente obtidos durante a transformação de matérias-primas em produtos alimentares, resultando em forma líquida ou sólida. Por outro lado, “subprodutos” corresponde a uma designação que permite transmitir que “os resíduos alimentares” constituem substratos para recaptura de compostos funcionais com viabilidade no desenvolvimento de novos produtos com valor de mercado (Pintado & Teixeira, 2015).

Na indústria transformadora de hortofrutícolas, a maioria dos subprodutos são compostos por cascas, talos, polpas, sementes ou produtos que apresentam danos físicos ou químicos. Frequentemente, e apesar do seu valor significativo, estes subprodutos são comumente subaproveitados e o seu potencial valor é frequentemente perdido (Valente, 2015). Em 2010, um estudo realizado por Ayala-Zavala *et al.* caracterizou diversos volumes de subprodutos gerados na produção de diferentes hortofrutícolas minimamente processados tendo-se concluído que em alguns casos a quantidade de subproduto gerada excede a quantidade de produto final obtida. Estes materiais caracterizam-se por serem muito perecíveis tendo em conta o elevado teor de matéria orgânica presente em associação ao elevado teor de água (70 – 90 %) e à elevada contaminação microbiológica.

Em suma, a valorização de subprodutos agroalimentares apresenta-se hoje em dia, não só como uma necessidade, mas como uma oportunidade para obtenção de novos produtos de valor acrescentado e com grande impacto na economia das indústrias (Pintado & Teixeira, 2015).

1.2 Vias de valorização tradicionais

As vias mais comuns para a valorização dos resíduos ou subprodutos das indústrias hortofrutícolas são, a alimentação animal e a compostagem. Estas vias de valorização tradicionais acarretam custos elevados, e, muitas vezes, subestimados pelas próprias empresas, implicando assim, retorno económico marginal ou negativo.

A utilização destes materiais na alimentação animal, na cumpre para além disso os requisitos para uma alimentação animal equilibrada em termos nutricionais, como é disso exemplo, as cascas de batata, provenientes do processamento mínimo, que apresentam teores de fenólicos e de glicoalcalóides, elevados (Raimundo, 2018; Cavaleiro, 2011). Em termos de retorno económico, os preços de venda destes subprodutos dificilmente compensam os custos de transporte. Acresce que os elevados teores de água provocam uma grande suscetibilidade à degradação microbiana impossibilitando trajetos longos e demorados (Bouallagui *et al.*, 2005; Raimundo, 2018).

Segundo Tchobanoglous & Kreith (2002), a compostagem é um processo de biodegradação de matéria orgânica por ação de microrganismos. A velocidade de decomposição dessa matéria e a qualidade do produto final dependem de fatores como a composição e o grau de mistura das matérias vegetais, a presença de oxigénio, o teor de humidade, a temperatura e os nutrientes. Este processo exige na maioria das vezes, a aplicação de pré-tratamentos como a remoção de água e a neutralização do pH, de forma a garantir melhores a otimização do desenvolvimento microbiano. O produto final deste processo é um composto homogéneo, que pode ser rico em nutrientes, sendo isento de patogénicos, e podendo ser aplicado no solo como fertilizante ou corretivo orgânico (Epstein, 2011).

A alternativa de enviar esta matéria vegetal para aterros envolve igualmente custos elevados de transporte e depósito a que podem acrescer problemas ambientais, nomeadamente relacionados com as emissões de gases com efeito estufa (produção de gás metano de forma excessiva e descontrolada) (Raimundo, 2018).

Com base nas considerações referidas e a crescente preocupação com os impactos ambientais, conclui-se que as utilizações das referidas vias enquanto processos de

valorização de subprodutos e resíduos de origem vegetal não são adequadas. Os custos económicos imputados aos pré-tratamentos, acrescidos aos custos de armazenamento e de transporte tornam estas opções economicamente pouco atrativas. Em suma, deve ser realçada e considerada a possibilidade de implementar processos inovadores que associem valor acrescentado a este tipo de materiais. Além disso, a utilização de processos economicamente mais sustentáveis repercute-se na redução de custos e aumento das receitas destas indústrias (Wognum *et al.*, 2011).

2 COMPOSIÇÃO BIOATIVA DE HORTOFRUTÍCOLAS

O reino vegetal inclui uma gama diversificada de compostos orgânicos necessários para o seu desenvolvimento e sobrevivência. Estes podem ser divididos em duas categorias: metabolitos primários e metabolitos secundários. Os metabolitos primários, são substâncias químicas destinadas ao crescimento e desenvolvimento, tais como hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas e lípidos, e são responsáveis por funções vitais nas plantas, tais como a fotossíntese, a respiração celular e o transporte de solutos. Os metabolitos secundários, ao contrário dos anteriores, não possuem uma distribuição universal, ocorrendo em pequenas quantidades nas plantas. Estes metabolitos são considerados compostos bioativos que para além de atuarem no sistema de defesa das plantas, contribuem para uma alimentação saudável, devido à sua eficiente ação antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, entre outros (Aguiar, 2017; Luís, 2014).

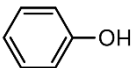
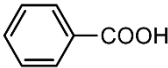
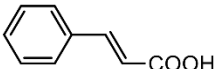
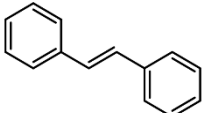
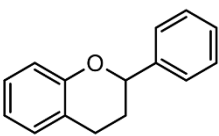
Os hortofrutícolas são uma fonte natural de fibras, vitaminas, sais minerais e um grande número de compostos fitoquímicos responsáveis pelas suas propriedades bioativas (Slavin & Lloyd, 2012). Atualmente, inúmeros estudos científicos têm demonstrado que o consumo regular destes alimentos está diretamente relacionado com a prevenção de incidência de doenças crónicas. Estes benefícios, muitas das vezes, estão relacionados à composição fitoquímica que apresentam uma capacidade antioxidante que ao interagir com os radicais livres previnem os danos celulares oxidativos (Aguiar, 2017; Lobo *et al.*, 2010).

Tendo em consideração as propriedades dos hortofrutícolas anteriormente referidas, os materiais descartados no processamento de hortofrutícolas ganham uma especial atenção, tornando-se alvo de uma intensa investigação enquanto matrizes para extração de diferentes tipos de antioxidantes e fibras alimentares. Neste sentido, segue-se uma descrição sumária daqueles que apresentam relevância bioativa, nomeadamente os compostos fenólicos, os carotenoides, as vitaminas, a fibra e os minerais, assinalando-se posteriormente as várias metodologias e matrizes de extração destes compostos.

2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, também designados por polifenóis, são uma das maiores classes de metabolitos secundários das plantas, constituindo um dos grupos mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal, em que são conhecidos mais de 8000 compostos. Estruturalmente, os compostos fenólicos são substâncias que compreendem um anel aromático, o benzeno, ligado a um ou mais grupos hidroxilo, que podem variar desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados de elevada massa molecular, como os taninos (Aguiar, 2017; Bravo, 1998). Tendo em conta a diversidade estrutural, em 1982, Harborne & Baxter categorizaram estes compostos em vários grupos, como se mostra na Tabela 1. O Interesse destes compostos deve-se não só aos benefícios na atividade anti-inflamatória, como também pelo facto de impedir não só a aglomeração das plaquetas sanguíneas, mas também a ação de radicais livres sobre o organismo.

Tabela 1 – Algumas classes de compostos fenólicos (Adaptado de: Aguilar, 2017; Harborne & Baxter, 1982).

Classe	Estrutura Básica	Estrutura química	Fontes Alimentares
Fenóis simples	C6		Vagens de baunilha Medronheiro
Ácidos hidroxibenzoicos	C6-C1		Maçã, cenoura
Ácidos hidroxicinâmicos	C6-C3		Amora, kiwis, ameixas, cereja, maçãs, tomate, cereais e café
Estilbenos	C6-C2-C6		Mirtilos, framboesas, amoras e amendoim
Ligninas	(C6-C3) _n		Linhaça, cenoura, aspargos e alho
Flavonoides	C6-C3-C6		Maçã, laranja, limão, cereja, amora, ameixa e mirtilos

Atualmente, vários autores dividem os compostos fenólicos em dois grandes grupos, nomeadamente os flavonoides e os não flavonoides. Dentro do grupo dos não flavonoides temos os ácidos fenólicos, estilbenos e ligninas, enquanto que o grupo dos flavonoides são todos aqueles que são constituídos por dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de três carbonos, normalmente na forma de um anel heterocíclico (Aguiar, 2017; Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009).

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos presentes na natureza, agrupando mais de 3000 estruturas químicas, e desempenham um papel fundamental na defesa contra os agentes patogénicos e herbívoros, assim como, na proteção contra radiação ultravioleta. De acordo com as suas características químicas e biossintéticas, os flavonóides classificam-se, principalmente, em flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianidinas (Tapas, Sakarkar, & Kakde, 2008). Estes compostos encontram-se amplamente distribuídos nos hortofrutícolas e são responsáveis pela qualidade sensorial, nomeadamente a cor dos mesmos, sendo de entre os fenólicos os que apresentam maior atividade antioxidante (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). As propriedades dos flavonoides, para além de serem benéficas para a saúde, melhoram funções cognitivas e possuem atividade antidepressiva. Podem ainda ser utilizados na indústria da cosmética e farmacêutica como substitutos aos antioxidantes sintéticos (Raimundo, 2018).

O grupo dos não flavonoides raramente contribuem para a cor dos alimentos, sendo a maioria destes compostos incolores ou de coloração amarelada ou acastanhada. Do ponto de vista químico, os ácidos fenólicos são substâncias constituídas por um anel fenólico ligado a um ácido carboxílico funcional que apresenta maior interesse, devido às suas propriedades antioxidantes. O grupo dos não flavonoides é dividido em dois subgrupos, nomeadamente os ácidos hidroxibenzoicos, que são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrossolúveis e são menos abundantes nos vegetais consumidos pelos humanos, e os ácidos hidroxicinâmicos, que por outro lado, são compostos aromáticos presentes numa grande variedade de alimentos (Aguiar, 2017).

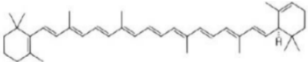
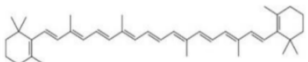

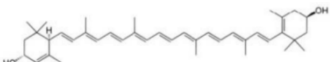
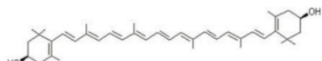
2.2 Carotenoides

Os carotenoides pertencem a uma família de pigmentos naturais, dos quais estão atualmente reconhecidas e quimicamente caracterizadas 600 variantes estruturais. Estes constituem um grupo de pigmentos lipossolúveis que conferem cor, nomeadamente as colorações amarela, laranja, vermelha e o violeta, dependendo do tipo e concentração de a carotenoides presentes nos hortofrutícolas. O conteúdo de carotenoides depende de vários fatores, tais como, variedade genética, estado de maturação, armazenamento pós-colheita,

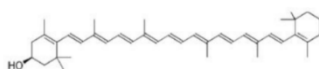
processamento e confecção. Com base na sua composição estes compostos podem ser divididos em dois grandes grupos: os carotenos, que são hidrocarbonetos puros, e as xantofilas, que derivam dos carotenos por oxidação (Tabela 2). Neste ultimo grupo encontram-se por exemplo, a luteína, a zeaxantina, β -criptoxantina e a capsantina (Britton *et al.*, 2004; Kuzina, 2014).

Entre os carotenos, podemos encontrar compostos designados por α -, β - e γ -caroteno e licopeno. Neste grupo destacam-se o α - e o β -caroteno devido à sua capacidade de se converterem em vitamina A sendo por isso denominados de pró-vitamina A (Stahl & Sies, 2005). Enquanto que o α -caroteno apresenta uma taxa de conversão teórica em vitamina A de cerca de 50 a 53%, o β -caroteno apresenta uma maior taxa de conversão, de 100% (Desobry *et al.*, 1998). Esta vitamina intervêm na síntese de hormonas, na resposta imunológica, na regulação do crescimento e diferenciação celular. Possui ainda atividade antioxidante sobre os radicais de oxigénio contribuindo para a diminuição do stress oxidativo no organismo (Stahl & Sies, 2005).

Tabela 2 - Estrutura química das diferentes pigmentos de carotenoides e as suas respetivas fontes naturais (Adaptado de Landrier et al., 2012; Silva, 2016).

Carotenoides	Estrutura Química	Fontes Alimentares
α -caroteno		Espinafre, alface, manga, meloa, melão, abóbora, cenoura, batata-doce
β -caroteno		Cenoura, batata-doce, abóbora, espinafre, melão, manga, damasco, nêspira, kiwi, alface
Licopeno		Tomate, melancia, goiaba, toranja, pêssago, papaia, damasco
Luteína		Espinafre, milho, diospiro, pimento vermelho, pêssago, ameixas, abobora, kiwi, alface
Zeaxantina		Espinafre, milho, diospiro, pêssago, ameixas, abobora, kiwi, alface, manga

β-criptoxantina



Mamão, milho, ervilhas, pera,
ameixas, abóbora, laranja,
pêssego, tangerina

A Luteína e zeaxantina são xantofilas resultantes do processo de hidroxilação de α - e β -caroteno, respetivamente, que possuem igualmente atividade de pró-vitamina A. Durante a maturação dos frutos, a conversão a luteína e zeaxantina provoca uma diminuição nos níveis de α - e β -caroteno. Estudos recentes sugerem que estes compostos podem manter o coração saudável pois contribuem para a redução dos riscos de doenças cardiovasculares e, também, protegem a pele dos danos causados por radiação UV (Kuzina, 2014; Marinova & Ribarova, 2007). Em suma, diversos estudos apontam que o carácter antioxidante dos carotenoides desempenha um papel importante na redução do risco de doenças cancerígenas, doenças degenerativas e no processo de prevenção do envelhecimento (Raimundo, 2018).

2.3 Vitaminas

As vitaminas são um grupo de compostos orgânicos essenciais para o metabolismo do corpo humano, contribuindo para o crescimento e funcionamento do organismo bem como na manutenção da saúde. Na nutrição humana estão identificadas 13 vitaminas que se classificam, de acordo com a sua solubilidade, em dois grupos: vitaminas lipossolúveis (solúveis em gordura), representadas pelas vitaminas A, D, E e K e vitaminas hidrossolúveis (solúveis em água), compreendidas pelo grupo vitamínico B e pela vitamina C (Combs & San Diego, 2013; Paz, 2018).

A vitamina D pode ser formada na pele após exposição adequada ao sol e a vitamina K é normalmente produzida em quantidades suficientes por bactérias intestinais, o que contraria a ideia clássica das vitaminas serem substâncias que não podem ser sintetizadas pelo organismo humano. Deste modo, à exceção das vitaminas D e K, as restantes vitaminas são exclusivamente fornecidas por fontes alimentares, uma vez que não podem ser produzidas pelo corpo humano (Ball, 2004; Paz, 2018).

As vitaminas lipossolúveis podem ser armazenadas durante algum tempo no corpo humano, não necessitando de um fornecimento diário. A vitamina A, no consumo alimentar diário, pode ser ingerido sob duas formas: a provitamina A e os retinoides. Esta vitamina é essencial para o crescimento e funcionamento do sistema imunitário, bem como a proteção da visão e da pele. A vitamina D, pode ser obtida a partir de fontes alimentares, como por exemplo com o consumo de gema de ovos, peixes gordos e leite, sendo absorvida no intestino delgado com a ajuda de sais biliares, ou pode ser sintetizada na pele por exposição à luz

solar. No caso da vitamina E, é o termo coletivo para os compostos que exibem atividade biológica de α -tocoferol, esta baseia-se principalmente nas suas propriedades antioxidantes, sendo fundamental na manutenção da integridade e funcionalidade das membranas celulares das células do corpo humano. Por fim, a vitamina K é essencial no processo de coagulação do sangue e na síntese de algumas proteínas importantes para o metabolismo ósseo e outros processos fisiológicos (Ball, 2004; Paz, 2018).

As vitaminas hidrossolúveis predominam em alimentos não gordurosos e ricos em água, como os hortofrutícolas. Estas são facilmente eliminadas pelo organismo, daí que as situações de excesso sejam pouco frequentes. No entanto, também significa que a sua estabilidade química é menor e que não são armazenadas no organismo com facilidade, necessitando de uma reposição constante (Carvalho, 2014). Existem cerca de sete vitaminas do complexo B, as quais apresentam diversas funções tais como, participação na produção e crescimento de células do sangue, intervenção na obtenção de energia a partir de macronutrientes, contribuição para o normal funcionamento do sistema nervoso e hormonal, entre outras. A vitamina C, é comumente encontrada em citrinos, embora o teor de ácido ascórbico varie consideravelmente dependente da espécie, do estado de maturação, de condições edafoclimáticas e dos métodos de preparação alimentar. A sua ingestão é fundamental, para além de ser um reconhecido antioxidante natural, tem um papel importante na regeneração de outros antioxidantes, como por exemplo, a vitamina E (D. Valente, 2015).

A maioria destas vitaminas tem como fonte alimentar (Figura 1) o consumo de diversos hortofrutícolas, podendo fornecer ao organismo, os nutrientes que ele necessita e ao mesmo tempo proporcionar tudo o que é necessário para garantir o seu bom funcionamento.

Vitamina A		Vitamina E		Vitamina C	
+	-	+	-	+	-
Manga	Uva Branca	Abacate	Anona	Kiwi	Tânger
Damasco	Toranja	Nectarina	Melo	Papaia	Nêspera
Dióspiro	Pera	Papaia	Ananás	Laranja	Uva (Branca e Tinta)

Vitamina		Vitamina	
+	-	+	-
Cenoura	Maçã	Ervilha	Cenoura
Espinafre	Nectarina	Espinafre	
Pêssego	Pera	Repolho	

Figura 1 – Vegetais e Frutos como fonte alimentar de vitaminas (Adaptado de Associação Portuguesa de Nutrição, 2017)

2.4 Fibras

As fibras alimentares designam um conjunto de substâncias existentes nos alimentos de origem vegetal, que não podem ser digeridas pelas enzimas do nosso sistema gastrointestinal e por isso não são absorvidas. São compostos que têm muitos efeitos benéficos no nosso organismo, sendo mesmo essenciais para o normal funcionamento do sistema digestivo.

No vasto grupo das fibras alimentares podemos distinguir as fibras solúveis das insolúveis (Mineiro, 2014). A fibra solúvel é um dos nutrientes que mais se destaca nos frutos, principalmente concentrada na casca. Este tipo de fibra não é absorvido pelo organismo, sendo fermentada, no intestino delgado, pelas bactérias da microbiota intestinal, estando associada a melhorias na digestão, diminuição dos níveis de colesterol sanguíneos e regulação de hormonas produzidas nas paredes digestivas e no pâncreas. A figura 2 ilustra a presença de fibra em diferentes frutos (com casca) por 100 g (edível) (Associação Portuguesa de Nutrição, 2017).

As fibras insolúveis encontram-se principalmente nos hortícolas e nos cereais inteiros e seus derivados integrais. Este tipo de fibras têm uma importante função sobre o funcionamento do intestino grosso, facilitando a proliferação das bactérias não agressivas contribuindo para a proteção da parede do cólon (Mineiro, 2014).

Fruta	Abacate	Ameixa Branca	Ameixa Encarnada	Ameixa Seca	Ananás	Anona	Banana	Carambola	Cereja	Figo	Figo Seco	Framboesa	Kiwi	Laranja	Limão	Maçã com casca	Maçã sem casca	Melancia	Melão	Morango	Papão	Pera	Pêssego	Tangerina	Uva Branca	Uva Tinta	Uva Seca
Fibra (g)	3,0	1,6	1,9	15,6	1,2	2,4	3,1	1,7	1,6	2,3	11,0	6,7	1,9	1,8	2,1	2,1	1,9	0,3	0,9	2,0	2,3	2,2	2,3	1,7	0,8	0,9	6,1

Figura 2 - Presença de Fibras em diferentes frutos (com casca) por 100 g (edível) (Adaptado de Associação Portuguesa de Nutrição, 2017)

2.5 Minerais

Os sais minerais são substâncias inorgânicas que estão incluídas no grupo dos micronutrientes. Estas substâncias obtidas por meio de uma alimentação equilibrada e variada, são necessárias em quantidade reduzida (de 2500 mg a 1 mg ou menos), em comparação com a ingestão de macronutrientes, como a ingestão de proteína, glúcidos e gorduras (Barroso, 2014).

Os minerais são fundamentais para o bom funcionamento do nosso organismo e para a manutenção da saúde. Não seria possível ter dentes saudáveis, ossos fortes e músculos vigorosos sem a presença dos minerais. Na maior parte dos casos, os minerais encontram-se em diferentes alimentos, desde os hortofrutícolas (Figura 3) à carne e ao peixe. O cálcio e o ferro, têm uma função de construção para a constituição dos ossos e do sangue, respetivamente. Alguns minerais, designadamente o cálcio, o fósforo, o magnésio e o potássio, são necessários ao organismo em quantidades relativamente grandes, em oposição a outros cujas exigências na alimentação são muito menores, como é o caso do selénio. A ingestão excessiva de alguns minerais pode perturbar o equilíbrio homeostático e causar efeitos colaterais tóxicos (Barroso, 2014).

Os hortofrutícolas são importantes fontes de minerais, nomeadamente, o fósforo, o cálcio, o ferro e o magnésio. Nestes, os teores de minerais presentes são variáveis, dependente da espécie e de fatores como a sazonalidade, as condições edafo-climáticas e o modo de consumo, ou seja, com ou sem casca e crua ou confeccionada (Adaptado de Associação Portuguesa de Nutrição, 2017).

Sódio		Cálcio		Ferro	
+	-	+	-	+	-
papaia	Framboesa	Laranja	Carambola	Uva Branca	Toranja
manga	Nectarina	Figo	Ameixa branca	Morango	Ameixa branca
Anona	Nêspera	Tangerina	Abacate	Figo	Maçã

Potássio		Fósforo		Magnésio	
+	-	+	-	+	-
Damasco	limão	Figo	Melancia	Banana	Carambola
Anona	Ameixa branca	Kiwi	Uva Tinta	papaia	marmelo
Romã		Morango	melão	Anona	Romã

Figura 3 – Exemplo de minerais encontrados em maior ou menor expressão em diferentes frutos (Adaptado de Associação Portuguesa de Nutrição, 2017).

3 VIAS DE VALORIZAÇÃO DE VALOR ACRESCENTADO

Segundo o Decreto Lei nº73/2011, a valorização dos materiais de origem vegetal encontra-se dividida em três vertentes, as quais são designadas como: valorização material, valorização orgânica e valorização energética.

A valorização material, consiste numa reciclagem ou recuperação dos materiais, na qual os materiais podem ser aplicáveis na reincorporação dos processos de fabrico da mesma

empresa ou no envio dos mesmos para outras unidades industriais (Baeta, 2014). Neste modo de valorização estão incluídos o envio destes materiais para alimentação animal e a recuperação de compostos bioativos de interesse.

Na valorização orgânica ocorre a transformação da fração orgânica presente nos subprodutos, dando origem a um composto semelhante ao solo ou a biocombustíveis líquidos ou gasosos (Baeta, 2014). A valorização através de compostagem e a produção de biogás através da digestão anaeróbia são exemplos desta via.

Por último, a valorização energética consiste na recuperação de energia, que pode ocorrer por incineração dos subprodutos ou por combustão de gases por eles produzidos (Baeta, 2014). Esta opção acarreta imensos impactos ambientais negativos entre os quais a libertação de gases e a produção de águas residuais e cinzas, e tendo em consideração a vasta gama de opções que atualmente existem, deve ser considerada a possibilidade de seleccionar a via de valorização que utilizem processos sustentáveis.

Para uma correta seleção da tecnologia de valorização de subprodutos é necessário ter o conhecimento da tipologia de matéria-prima processada, ou seja, todos os processos associados, como o conhecimento específico do sector e tipo de atividade praticada, processos de fabrico utilizados, da sazonalidade da produção e o seu armazenamento. Por outro lado, também é necessário caracterizar os subprodutos para prever as potenciais vias de valorização e respetivas aplicações. É tão importante conhecer o potencial de valorização dos subprodutos, como avaliar a existência de potenciais mercados alvo para os produtos desenvolvidos. A análise do potencial de utilização e viabilidade dos produtos a desenvolver pode ser realizada através de ensaios laboratoriais com validação de protótipos piloto, ou pode ser realizada a num nível superior através de testes semi-industriais ou industriais (Baeta, 2014; Value, 2012).

Em suma, a valorização de subprodutos agroalimentares apresenta-se hoje em dia, não só como uma necessidade, mas como uma oportunidade para obtenção de novos produtos de valor acrescentado e com grande impacto no desenvolvimento económica das empresas. Tendo em consideração a diversidade de compostos fitoquímicos de interesse bioativo presentes na matéria vegetal, a recuperação destes compostos a partir de subprodutos agroindustriais pode ter aplicação na própria indústria alimentar como na indústria farmacêutica e cosmética. Caso os subprodutos apresentem níveis de segurança microbiológica adequada, podem ainda ser utilizados para o desenvolvimento de novos produtos. Por fim, a utilização dos mesmos como substratos para a produção de biogás apresenta-se também como um processo de valorização promissor. Todas as vias anteriormente referidas não se excluem e podem ser integradas na mesma empresa.

3.1 Recuperação de fitoquímicos bioativos

A valorização de matéria vegetal eliminada, na ótica da extração de fitoquímicos inclui minerais, ácidos orgânicos, fibra, e compostos bioativos tais como os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, e os carotenóides (Djilas *et al.*, 2009).

Tendo em consideração que os desperdícios gerados nas indústrias de hortofrutícolas são constituídos maioritariamente por cascas, polpas e sementes, diversos autores sublinham que o potencial antioxidante é muito interessante tendo em conta a maior concentração destes nas cascas e sementes de alguns frutos, comparativamente com a parte edível.

Um estudo realizado por Gorinstein *et al.* (2001), conclui que o teor em compostos fenólicos nas cascas de limões, laranjas e toranjas é em média 15% superior ao avaliado na polpa destes frutos. Da mesma forma, cascas de maçãs, pêsegos e peras continham o dobro do teor de compostos fenólicos totais face aos determinados na polpa dos mesmos. O setor agroindustrial e a comunidade científica têm reunido esforços e realizando vários estudos para desenvolver alimentos funcionais, garantindo a promoção da saúde e o bem-estar dos cidadãos, promovendo a diversificação das dietas e tornando viáveis produtos de elevado valor acrescentado, criando novos nichos de mercado. Por esta razão, na sociedade atual, têm surgido processos emergentes para o aproveitamento sustentável dos subprodutos hortofrutícolas (Valente, 2015). Na Tabela 3, são apresentados diversos estudos no âmbito de desenvolvimento de alimentos funcionais utilizando compostos bioativos, nomeadamente compostos fenólicos, e fibras alimentares extraídos a partir de subprodutos da indústria de hortofrutícolas.

Tabela 3 – Estudos realizados com a incorporação de compostos fenólicos ou fibras alimentares resultantes de subprodutos de indústrias de hortofrutícolas em diferentes alimentos (Adaptado de Iriondo-DeHond *et al.*, 2018)

Produto	Composto	Subproduto utilizado	Referência
Leite fermentado	Compostos fenólicos	Bagaço de azeitona	Aliakbarian <i>et al.</i> , 2014
	Fibras	Bagaço de maçã	Issar <i>et al.</i> , 2016
logurte	Compostos fenólicos	Sementes de romã	Ersöz <i>et al.</i> , 2011
	Fibras	Casca, polpa e sementes de laranja	Yi <i>et al.</i> , 2014
	Compostos fenólicos	Casca de romã	El-said & Farahat, 2014

Queijo	Compostos fenólicos	Casca de romã	Çam <i>et al.</i> , 2013
Gelado	Compostos fenólicos	Pele de tomate	Rizk <i>et al.</i> , 2014
Manteiga	Compostos fenólicos	Pele de tomate	Kaur <i>et al.</i> , 2011
	Fibras	Laranja	Saraç & Dogan, 2016
	Fibras	Espinafres	Saraç & Dogan, 2016

3.2 Ingrediente alimentar

Os subprodutos originados na indústria de hortofrutícolas têm sido utilizados como ingredientes em produtos de panificação devido às suas excelentes propriedades funcionais. A sua utilização direta implica normalmente uma preparação prévia, como por exemplo a secagem, a fim de permitir melhor capacidade de conservação dos compostos de interesse a valorizar. Os de subprodutos sólidos ou líquidos concentrados a secagem pode efetuar-se por secagem convencional ou por liofilização (Kuzina, 2014).

Diversos estudos revelam que a incorporação de subprodutos de frutos em produtos de panificação como bolachas ou *muffins*, até determinados níveis, melhoraram o perfil funcional sem prejudicar as propriedades sensoriais do produto (Bora *et al.*, 2019). Em produtos de panificação, a substituição de farinhas de trigo por cascas de maçã ou polpa de manga resultou no fabrico de produtos sensorialmente aceitáveis com aumentos significativos no conteúdo de fibras e fenólicos (Rupasinghe *et al.*, 2008; Sudha *et al.*, 2015).

Na Tabela 4, são apresentados diversos estudos no âmbito de desenvolvimento de produtos de panificação com a incorporação de subprodutos de diferentes frutos.

Tabela 4 – Diversos estudos no âmbito de desenvolvimento de produtos de panificação com a incorporação de subprodutos de diferentes frutos.

Indústria	Subproduto	Produto	Referência
Sumos	Fibras de polpa de manga	Muffins	(Sudha <i>et al.</i> , 2015)
Sumos	Subproduto de bagas de goji	Bolachas	(Bora <i>et al.</i> , 2019)
Pastelaria	Cascas de maçã	Muffins	(Rupasinghe <i>et al.</i> , 2008)

Minimamente processados	Maças descartadas	Muffins	(Santos, 2017)
--------------------------------	-------------------	---------	----------------

3.3 Valorização energética

A digestão anaeróbia constitui uma alternativa mais sustentável para a valorização dos subprodutos hortofrutícolas em comparação aos processos tradicionais (compostagem e inceneração), com grande potencial. A digestão anaeróbia consiste num processo anaeróbio de conversão de matéria orgânica complexa em metano e dióxido de carbono realizado por microrganismos. A partir deste processo obtém-se um gás combustível, designado por biogás, e um efluente digerido de utilidade agrícola (Baeta, 2014; Lastella *et al.*, 2002). Esta alternativa possibilita reduzir os encargos com o destino final, controlar os odores e o volume de efluentes gerados, reduzir gastos com as taxas de admissão de resíduos nos sistemas municipais de tratamento, além de se poder utilizar o biogás produzido para substituir alguns combustíveis na própria unidade industrial (Crespo, 2013).

A implementação de biogás como fonte de energia renovável apresenta inúmeras vantagens tais como, a diminuição da dependência de combustíveis fósseis, uma vez que é um combustível de alta qualidade. Pode ser produzido a partir de quase todos os tipos de matérias-primas orgânicas, dando resposta à gestão inadequada de subprodutos agroindustriais. Reduz as emissões de metano (CH_4), um gás com potencial de efeito estufa 25 vezes maior que o dióxido de carbono (CO_2). Por fim, para além da produção de biogás ser utilizado como fonte energética, o efluente gerado pode ser também utilizado como fertilizante dos solos (Baeta, 2014).

Atualmente, existem inúmeros estudos que confirmam esta via de valorização para subprodutos hortofrutícolas, uma vez que estes materiais apresentam elevada percentagem de humidade, conteúdo orgânico elevado e são facilmente bio degradados (Appels *et al.*, 2008; Raimundo, 2018). Diversos estudos aplicam o processo de digestão anaeróbia utilizando subprodutos hortofrutícolas, mas poucos os que tenham utilizado apenas um único substrato. Além disso, muitos estudos realizados mostram que a utilização destes subprodutos no processo de digestão anaeróbia sem nenhum co substrato torna-se um desafio devido às quantidades de açúcares que promovem uma rápida acidificação da biomassa resultando na inibição da atividade das bactérias metanogêneas (Ohenewa, 2016; Scano *et al.*, 2014)

Efísio *et al.* (2014), indicam que para maximizar e melhorar a taxa de produção de biogás (elevado teor de metano e baixo teor de sulfureto, são necessárias adotar determinadas estratégias. Por exemplo, a utilização, como substrato de alimentação, de uma

mistura de subprodutos adequada, cujo teor de açúcar seja inferior a 40%. Outra estratégia, refere que a utilização de vegetais folhosos têm de ser criteriosamente selecionada para prevenir o excesso de sulfureto na produção de biogás. Em suma, utilizar subprodutos hortofrutícolas como uma codigestão é uma alternativa para promover a produção de biogás (Ohenewa, 2016; Scano *et al.*, 2014).

4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE INTERESSE

Nos últimos 50 anos, têm-se assistido ao desenvolvimento e otimização de diversos métodos de extração de compostos bioativos para dar resposta à aposta crescente na valorização de recursos naturais. Para tornar mais os processos de extração mais eficientes e sustentáveis face aos métodos convencionais (ex. extração por *Soxhlet*) têm sido desenvolvidos novos métodos em que se associam técnicas não convencionais como por exemplo a utilização de ultrassons e de micro-ondas. Estes processos pretendem tornar mais eficiente a extração de compostos bioativos a partir de amostras complexas e proporcionar métodos reprodutíveis que sejam independentes de variações nas matrizes utilizadas (Azmir *et al.*, 2013; M. P. Santos, 2014).

4.1 Métodos convencionais

4.1.1 Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido consiste na separação de componentes solúveis, contidos numa matriz sólida, com a aplicação de um solvente. Este mecanismo envolve a penetração de um solvente na matriz sólida que leva a uma dissolução e transporte dos solutos do interior das partículas solidas. Neste processo existem diversos fatores que afetam a eficiência de extração e o seu rendimento, entre os quais, o tipo de solvente utilizado, o tamanho das partículas e a presença de substâncias interferentes na matriz. Esta extração é muito utilizada para recuperar diversos compostos bioativos de origem vegetal devido à sua fácil utilização. (M. P. Santos, 2014)

Peschel *et al.* (2006), utilizando diferentes subprodutos hortofrutícolas testaram a extração de compostos fenólicos através do método sólido-líquido, utilizando diferentes solventes: água, metanol, etanol, acetona e hexano, (diluição 10:1). Do mesmo, concluíram que a extração fenólica foi maximizada pela utilização de metanol, no caso da maçã (52.18 ± 4.80 mg GAE/ g) e de acetona no caso da pera (27.26 ± 2.65 mg GAE/ g).

4.1.2 Extração por Soxhlet

Esta técnica consiste na introdução da amostra num cartucho, que posteriormente será colocado no extrator de *Soxhlet*. Este será inserido num balão de destilação que contém no seu interior o solvente de extração, que por sua vez é colocado um condensador. O solvente é aquecido sob refluxo e o seu vapor é condensado, levando a que a solução atinja o máximo na câmara de extração, conduzindo-se para o sifão. Este quando cheio descarrega para o balão a solução que transporta os componentes solúveis da amostra (Figura 4) (Azmir *et al.*, 2013; Cunha, 2011; M. P. Santos, 2014).

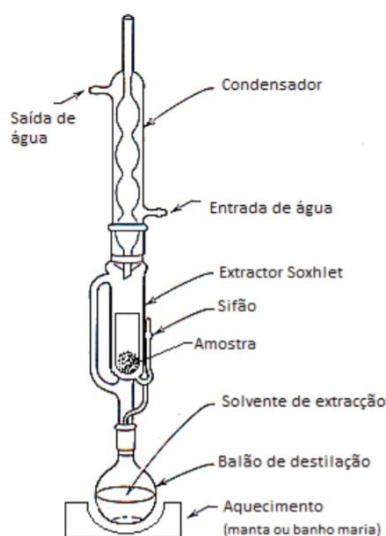


Figura 4 – Esquema ilustrado de uma extração Soxhlet (Cunha, 2011)

No estudo de Benelli *et al.* (2010), utilizando subprodutos de laranja, comparou-se a extração de compostos bioativos utilizando o método de extração com fluídos supercríticos face ao método convencional por *Soxhlet*. Concluíram que o método de extração por Soxhlet, utilizando água como solvente, foi mais eficiente que o método de extração com os fluidos supercríticos utilizando dióxido de carbono e etanol como solventes.

4.1.3 Maceração

Esta técnica permite a obtenção de óleos essenciais e outros produtos naturais a partir de materiais vegetais. Inicia-se com a imersão do material vegetal num solvente apropriado num recipiente fechado, à temperatura ambiente durante um longo período de tempo, sob agitação continua ou ocasional para promover a extração. Por fim, ocorre a separação do material vegetal residual (bagaço) por decantação, seguido de uma etapa de filtração para obtenção do filtrado (macerado) (Azmir *et al.*, 2013; M. P. Santos, 2014).

Em 2016, Saddozai *et al.* desenvolveu um estudo com o objetivo de extrair e quantificar compostos fenólicos de subprodutos de tangerina comparando o método de extração assistido por ultrassons com o método de maceração. Neste estudo conclui-se que ambos os métodos obtiveram taxas de extração semelhantes de cerca de 19%.

4.1.4 Hidrodestilação

A hidrodestilação é um método convencional para obtenção de compostos bioativos e óleos essenciais, não envolvendo qualquer solvente orgânico. Inicialmente matriz é acondicionada num recipiente e adicionada água em quantidade suficiente, de seguida essa mistura é aquecida até a água entrar em ebulição (Figura 5). Desta forma, a água quente e o vapor atuam como os principais agentes para a libertação do óleo. Por fim o óleo e os compostos bioativos separam-se por condensação e diferença de densidades (Azmir *et al.*, 2013; Cardoso, 2017).

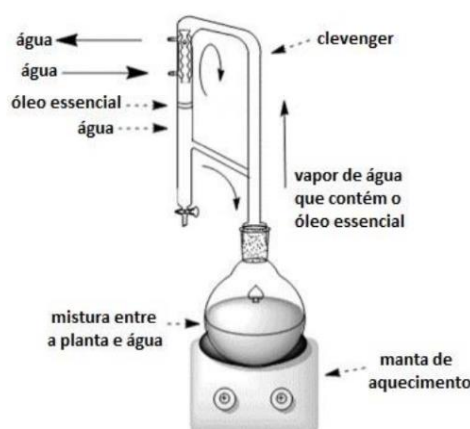


Figura 5 - Esquema ilustrado da técnica de extração por hidrodestilação (Cardoso, 2017; Samadi *et al.*, 2017).

O estudo anteriormente referido de Benelli *et al.* (2010), comparou a extração de compostos bioativos a partir de subprodutos de laranja utilizando os métodos de hidrodestilação e Soxhlet. O método de extração por hidrodestilação apresentou uma eficiência de extração muito baixa comparativamente com qual método de Soxhlet.

4.2 Métodos não convencionais

4.2.1 Extração assistida por ultrassons

A extração assistida por ultrassons (EAU), é uma técnica usada no processamento de alimentos com diversas finalidades, incluindo extração, secagem, emulsificação e

homogeneização, entre outros (Marić *et al.*, 2018; Misra *et al.*, 2017). No caso da extração de compostos bioativos, a aplicação ultrassônica promove a ruptura celular causada pelo efeito de cavitação induzida, originando uma entrada do solvente nas células e uma intensificação de transferência de massa (Marić *et al.*, 2018). Esta técnica é dependente de vários fatores como a frequência de ultrassons utilizada, poder de sonicação, tempo e distribuição de ondas ultrassônicas (Sharayei, Azarpazhooh, Zomorodi, & Ramaswamy, 2019).

Existem muitos estudos que demonstram o aumento significativo da eficiência de extração de compostos bioativos em diversos hortofrutícolas pela aplicação de ultrassons. Autores como Rodsamran & Sothornvit (2019), desenvolveram um estudo que compara o método de extração assistida por ultrassons com o método assistido por micro-ondas, extraindo compostos fenólicos de subprodutos de lima. Este estudo permitiu concluir que utilizando etanol numa concentração de 55%, obtém-se uma extração de compostos fenólicos pelo processo de ultrassons e micro-ondas de, 54 ± 1 mg GAE/ g e 53 ± 1 mg GAE/ g, respetivamente.

4.2.2 Extração com líquido pressurizado

A técnica extração com líquido pressurizado (ELP) é baseada no uso de solventes líquidos com elevada pressão e temperatura, sob condições nas quais os solventes são mantidos no estado líquido durante o processo de extração. Devido ao aumento dos compostos solúveis da amostra e da diminuição da viscosidade do solvente e tensão superficial, consegue-se alcançar uma elevada taxa de transferência de massa, que consequentemente irá aumentar a taxa de extração, uma vez que solvente penetrar mais facilmente na matriz (Herrero, Sánchez-Camargo, Cifuentes, & Ibáñez, 2015).

Wijngaard, Ballay, & Brunton (2012) efetuaram um estudo que tinha como objetivo otimizar a extração de compostos antioxidantes de casca de batata utilizando o método convencional (sólido-líquido) versus o método ELP. Conclui-se do mesmo que taxa de extração foi mais eficiente utilizando método com líquido pressurizado.

4.2.3 Extração com água supercrítica

Segundo Herrero *et al.* (2015) a técnica extração com água supercrítica (EAS) é semelhante à técnica ELP, com a diferença que se usa a água como solvente de extração. Este solvente é colocado a temperaturas entre 100 a 374°C e numa pressão que o mantenha no estado líquido, durante o processo de extração. À medida que a temperatura aumenta, ocorre uma diminuição acentuada e sistemática da permissividade, na viscosidade e na tensão superficial, e ocorre um aumento na taxa de difusão. Como consequência das

características mencionadas anteriormente, amostras mais polares e altamente solúveis, em condições de temperatura mais baixas, são extraídos mais eficientemente, enquanto que amostras moderadamente polares e não polares, requerem uma temperatura mais elevada (Asl & Khajenoori, 2013; Ramos, 2016).

Um estudo que teve como objetivo extrair compostos fenólicos de subprodutos de batata utilizando o método de extração com água supercrítica, teve como resultado uma quantidade de compostos fenólicos de 81,33 mg/ 100 g que comparando a utilização de outros solventes como o metanol ou etanol (46,36 mg/ 100 g e de 29,52 mg/ 100 g, respetivamente), demonstrou uma maior eficiência (Singh & Saldaña, 2011). Como referido anteriormente, esta técnica utiliza água como solvente, sendo por isso uma opção mais ecológica.

4.2.4 Extração assistida por micro-ondas

Os micro-ondas são utilizados como uma ferramenta muito importante na ciência e tecnologia alimentar. Esta técnica é utilizada com o objetivo de secar alimentos, extrair compostos, inibir ou inativar enzimas e microrganismos, e é considerado apropriada para processar vários subprodutos da indústria alimentar (Marić *et al.*, 2018). A extração assistida por micro-ondas (EAM) é um processo que utiliza a ação da energia gerada pela aplicação de micro-ondas para aquecer o solvente em contacto com a amostra. A utilização de frascos fechados faz com que o processo extrativo possa ser realizado a temperaturas elevadas, facto este que acelera a transferência de massa dos compostos de interesse presentes na matriz. Esta técnica consiste na mistura da amostra e de um solvente capaz de absorver radiação de micro-ondas num recipiente fechado. Normalmente, este processo apresenta um tempo máximo de extração de 30 minutos e volumes de solvente que nunca ultrapassam os 40 mL. Esta técnica apresenta maior eficiência, quando em comparação com métodos convencionais, uma vez que é possível extrair várias amostras simultaneamente (Coelho, 2013; Eskilsson & Björklund, 2000).

Em 2019, Kaderides *et al.* desenvolveram um estudo que teve como objetivo otimizar o processo de extração de compostos fenólicos de subprodutos de romã assistida por micro-ondas, como também, comparar com o método de extração assistido por ultrassons. Neste estudo, concluiu-se que não só o método EAM teve uma maior eficácia na extração de compostos fenólicos (199.4 mg GAE/ g) comparando com o método EAU (119.82 mg GAE/ g), como também demonstrou ser o processo mais rápido.

4.2.5 Extração com fluidos supercríticos

A extração com fluidos supercríticos (EFS) tem como principal área de aplicação os óleos essenciais. É um processo baseado no uso de solventes que estejam acima ou perto do ponto crítico de temperatura e pressão, de forma a recuperar extratos das suas matrizes sólidas. Num estado supercrítico, o solvente tem propriedades intermédias entre gases e líquidos, em que o torna útil como solvente de vários compostos (Galanakis, 2015).

Como o dióxido de carbono é uma substância não tóxica, inerte, não inflamável e não corrosiva, é o fluido supercrítico mais utilizado (Coelho, 2013; Teixeira, 2003). No entanto, devido à sua apolaridade, este fluido não é eficiente na extração de moléculas polares, como é o caso dos compostos fenólicos, sendo necessário recorrer à introdução de solventes, como o metanol e o etanol, que aumentem o poder de solvatação do CO₂. Assim pode-se garantir o aumento da seletividade e do rendimento de extração do composto alvo (Coelho, 2013; Santos *et al.*, 2012).

Mosibo *et al.* (2018) desenvolveu um estudo que compara a extração de antioxidantes de subprodutos de maçã pela técnica de fluidos supercríticos com o método convencional por Soxhlet. Neste estudo, utilizando etanol com uma concentração de 5%, foi demonstrado que a técnica de extração com fluidos supercríticos teve maior eficácia que o método convencional.

4.2.6 Extração através de enzimas

A adição de enzimas como a celulase, α -amilase e a pectinase durante o processo de extração aumenta a recuperação por promoverem a rutura da parede celular e hidrolisarem os polissacarídeos estruturais e os compostos lipídicos da matriz, aumentando a permeabilidade celular (Marić *et al.*, 2018; Rosenthal, Pyle, & Niranjana, 1996). A técnica de extração através de enzimas (EAE) depende de vários fatores como a composição e concentração da enzima, tempo de reação, temperatura, pH e tamanho da amostra (Marić *et al.*, 2018).

Com o objetivo de otimizar o processo de extração de compostos fenólicos de subprodutos de vários citrinos através de enzimas, Li, Smith, & Hossain (2006), desenvolveu um estudo que utilizou esta técnica em 5 citrinos diferentes, testando diferentes enzimas e condições de temperatura. Neste estudo conclui-se que a toranja foi o citrino com maior quantidade de compostos fenólicos, que poderiam variar entre 90 a 162 mg GAE/ g, a uma temperatura de 50° C, utilizando a enzima *Celluzyme MX*.

4.2.7 Extração por campo de pulsos elétricos

O processo por campo de pulsos elétricos foi reconhecido como útil para melhorar os processos de prensagem, secagem, extração e difusão. A técnica de extração por campo de pulsos elétricos (EPE), tem como princípio destruir a estrutura da membrana celular para promover a extração. Um campo elétrico atravessa as células vivas através da membrana celular para o interior da célula, separando as moléculas de acordo com a sua carga (Azmir *et al.*, 2013). A eficiência deste processo depende de vários parâmetros como a força do campo, a entrada específica de energia, número de pulsos, temperatura de tratamento e das características da amostra (Azmir *et al.*, 2013; Heinz, Toepfl, & Knorr, 2003).

4.2.8 Métodos convencionas de extração versus métodos não convencionais

Na Tabela 5 apresenta-se a comparação entre técnicas convencionais e não convencionais.

Tabela 5 - Comparação entre as técnicas de extração convencionais e não convencionais (Adaptado de Coelho, 2013)

Método	Vantagens	Desvantagens
Sólido-líquido	Processo simples, contínuo, rápido e económico.	Elevado consumo de solvente. Necessita de otimização de parâmetros.
Soxhlet	Processo contínuo, económico e apresenta alto rendimento. Não requer filtração posterior.	Temperaturas elevadas e consumo grande de volume de solvente. Processo de duração longa (48h) e requer limpeza posterior
Maceração	Simple, económica e adequada a grandes escalas. Realiza-se à temperatura ambiente (menos suscetível de provocar a degradação dos metabolitos termolábeis).	Tempo de extração longo. Pode consumir grandes volumes de solvente, o que pode originar perda de metabolitos ou material vegetal. Processo apresenta baixo rendimento comparativamente a outros processos de extração sólido-líquido.
Hidrodestilação	Processo rápido e prático. Requer baixo custos de investimento.	Atinge temperaturas elevadas, podendo levar à destruição de certos compostos que consequentemente diminui a qualidade do óleo essencial, assim como a possibilidade de ocorrência de reações de hidrólise.

Tabela 5 (continuação)

Método	Vantagens	Desvantagens
EAU	Processo rápido e múltiplo. Baixo investimento.	Necessita de grandes volumes de solvente. Pode ser necessário repetições e requer uma limpeza posterior.
ELP	Processo rápido. Requer pequenos volumes de solvente. Não requer nenhuma etapa de filtração adicional. Sistema automático	Processo requer um alto investimento, e tem uma baixa taxa de transferência. Necessita de um passo de limpeza posterior.
EAS	Consumo reduzido de solvente. Considerado dos métodos mais sustentáveis, pois utiliza água como solvente.	Requer a otimização dos vários parâmetros analíticos. Elevado investimento inicial.
EAM	Processo rápido e múltiplo, pouco consumo de volume de solvente. Capacidade de aquecer rapidamente a mistura amostra-solvente.	Altas temperaturas e uso de solventes polares.
EFS	Proporciona extratos sem vestígios de solvente, utiliza baixas temperaturas e tempos de operação curtos (diminuição do risco de degradação de compostos mais sensíveis ao calor). Não requer filtração ou limpeza posterior. Sistema automático.	Alto investimento. Número de parâmetros a otimizar e a extração paralela de compostos indesejados.
EAE	Processo que pode ser utilizado a temperaturas baixas e consome pouca energia.	Operação longa em condições de elevada humidade.
EPE	Tempo reduzido de operação e baixo consumo de solvente.	Apenas aplicável a materiais com elevada condutividade.

Na Tabela 6, encontram diversos estudos os quais tiveram por objetivo a extração de diferentes compostos bioativos, utilizando diferentes matrizes, solventes e métodos.

Tabela 6 – Exemplo de métodos de extração de compostos bioativo utilizando matizes de subprodutos da indústria hortofrutícola

Método	Subproduto	Solvente	Compostos	Referência
Sólido-líquido	Maçã e pera	Água	Compostos fenólicos	Peschel <i>et al.</i> , 2006
Soxhlet	Laranja	Água	Compostos bioativos	Benelli <i>et al.</i> , 2010
Maceração	Tangerina	Etanol 80%	Antioxidantes	Saddozai <i>et al.</i> , 2016
Hidrodestilação	Laranja	Água	Óleo essencial	Benelli <i>et al.</i> , 2010
EAU	Romã	Água	Compostos fenólicos	Tabaraki <i>et al.</i> , 2012
ELP	Maçã	Água	Flavonoides	Herrero <i>et al.</i> , 2010
EAS	Romã	Água	Compostos fenólicos	He <i>et al.</i> , 2012
EAM	Romã	Etanol 50%	Compostos fenólicos	Hayat <i>et al.</i> , 2009
EFS	Maçã	Etanol 5%	Capacidade antioxidante	Mosibo <i>et al.</i> , 2018
EAE	Toranja	Água	Compostos fenólicos	Li <i>et al.</i> , 2006
EPE	Laranja	Etanol 40%	Compostos fenólicos	Luengo <i>et al.</i> , 2013

II - MATERIAIS E MÉTODOS

5 Determinações físico-química e bioquímicas

5.1 Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis totais (TSS) foi determinado a partir de uma filtração de um homogeneizado da amostra em água destilada (1:1, p:p), com o auxílio de um filtro de pano. Este procedimento foi realizado com a utilização de um refratômetro digital (Atago PAL-1, Tokyo, Japan), e os seus resultados são expressos em °Brix, representando a percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto, resultantes de 3 determinações por amostra.

5.2 Humidade

O teor de humidade (TH) foi determinado segundo o método descrito na NP – 875 (1994), onde a humidade se designa com a perda de massa sofrida pela amostra, seca a 100-105°C até massa constante. De acordo com a equação com 1, obtém-se o respetivo teor de humidade da amostra, consoante a massa inicial e a massa final, sendo os resultados médios expressos em % (m/m) e obtidos a partir da média de 3 determinações por amostra.

$$(Eq. 1) \quad \% \text{ Humidade} = \frac{(massa \text{ do cadinho } (g) + massa \text{ da amostra } (g)) - massa \text{ final } (g)}{massa \text{ da amostra } (g)} \times 100$$

5.3 Atividade de água

Para a obtenção da atividade de água (a_w) utilizou-se o aparelho Rotronic (Hygrobab), deixando a análise decorrer até valor constante. Quando atinge o valor constante, o equipamento indica diretamente o valor de a_w e a temperatura a que decorreu a análise. Foram efetuadas 3 medições por amostra, obtendo-se o resultado da média das mesmas.

5.4 pH

A determinação do pH foi realizada com o auxílio de um potenciômetro (Crison Instruments, Espanha), previamente calibrado a 20°C, com soluções tampão de pH igual a 7 e pH igual 4. O valor do pH foi obtido de um homogeneizado da amostra em água destilada (1:1, p:p), cujo o resultado foi determinado a partir dos valores médios de três determinações por amostra.

5.5 Acidez

A acidez titulável (AT) foi determinada segundo o método descrito na NP – 1421 (1977), e foi obtida a partir de um homogeneizado de amostra com água destilada (1:1, p:p) com o auxílio de um Polytron Ultra-Turrax (T-25 basic, IKA – Werke), de seguida efetuou-se uma filtração e perfez-se o filtrado para um balão de 100 mL.

Por fim, retirou-se 25 mL da solução obtida e procedeu-se à titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N, com o auxílio do doseador Metrohm 665 Dosimat, até que a solução atinja o pH de 8,2, anotando-se o volume de NaOH gasto.

5.6 Teor de minerais

Após a liofilização da amostra, procedeu-se a uma digestão em banho maria a 60°C durante 60 minutos com água regia (mistura de ácido nítrico com ácido clorídrico). Os minerais foram determinados por espectrometria de absorção atômica (*Thermoscientific iCAP7000 series ICP spectrometer*), no laboratório de Química do Instituto Superior de Agronomia., e os resultados apresentados correspondem à média de 3 determinações por amostra.

5.7 Capacidade antioxidante

A técnica utilizada para a determinação da capacidade antioxidante (AOx) teve por base os métodos descritos por Arnao *et al.*, (2001) e por Brand-Williams *et al.*, (1995) com algumas modificações, utilizando DPPH. Brevemente, o radical DPPH foi diluído em metanol (1:4.5, v:v) para obter uma absorvência inicial de 1.100 ± 0.020 unidades a $\lambda = 515$ nm prévio à sua utilização. O extrato é obtido por homogeneização da amostra em metanol (1:4, p:v) e incubação *overnight* (12 - 24 horas) a 5°C. Posteriormente, procede-se à centrifugação da mistura (10000 RPM, 30 minutos a 4°C – Sorvall RC5C, rotor SS34, Sorvall instruments)), reservando-se o extrato límpido. A determinação da capacidade antioxidante foi realizada a partir da reação de 150 μ L de extrato antioxidante com 2850 μ L da solução radical DPPH, durante 2 horas no escuro, à temperatura ambiente. Após reação, a redução da absorvência foi medida espectrofotometricamente a 580 nm. Uma curva padrão foi preparada utilizando Trolox como referência e os resultados são expressos em equivalentes de Trolox por 100 g de produto (ET.100 g⁻¹). Na Figura 6 encontra-se uma ilustração simplificada do método utilizado para a caracterização da capacidade antioxidante.

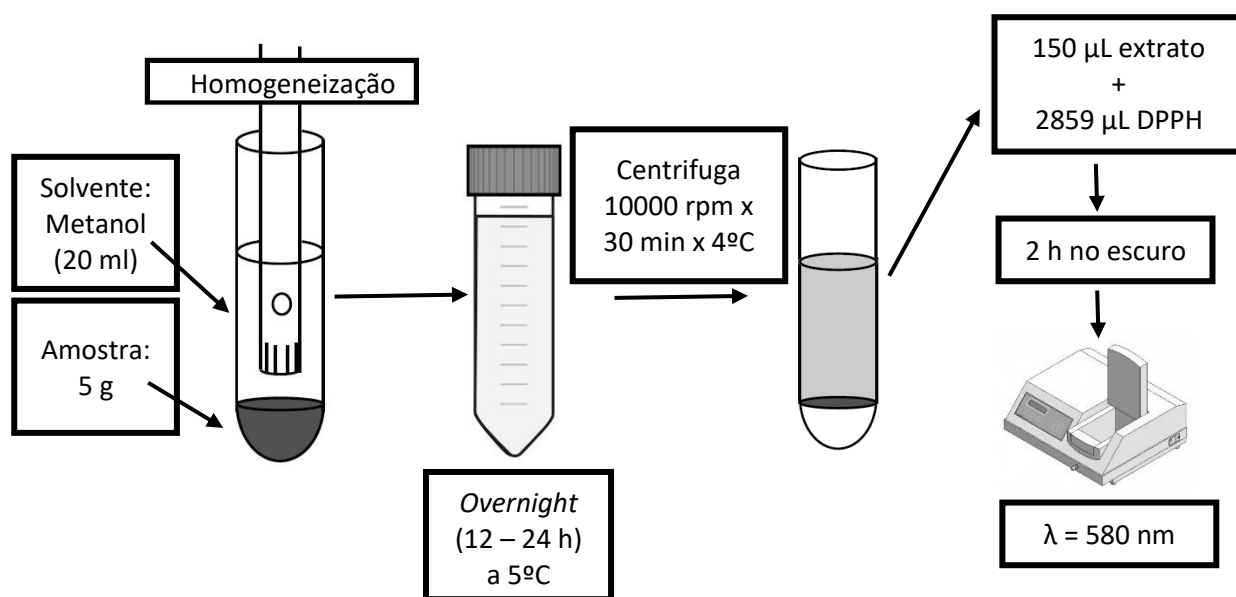


Figura 6 – Ilustração simplificada do método utilizado para a caracterização da capacidade antioxidante.

5.8 Compostos fenólicos

5.8.1 Método Foli-Ciocalteu

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais (CTF), teve por base o método descrito por Swain & Hillis (1945). O extrato é obtido por homogeneização da amostra em metanol (1:4, p:v) e incubação *overnight* (16 - 18 horas) a 5°C. Posteriormente, procede-se à centrifugação da mistura (10000 RPM, 30 minutos a 4°C – Sorvall RC5C, rotor SS34, Sorvall instruments), reservando-se o extrato límpido. O doseamento envolve a diluição de 150 µL do extrato metanólico em 2400 µL água nanopura, seguindo pela adição de 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído (0.25 N). A mistura é incubada durante 3 minutos (temperatura ambiente), seguindo-se pela adição de 300 µL de carbonato de sódio a 1N e incubação durante 2 horas no escuro (temperatura ambiente), após a reação, foi efetuado as leituras espectrofotométricas com um $\lambda = 725 \text{ nm}$, num espectrómetro Jasco V-550 UV/VIS – Spectrophotometer. Anteriormente, foi efetuada uma curva de padrão utilizado o ácido gálico como referência e o conteúdo de compostos fenólicos totais são expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de produto (EAG.100 g⁻¹). Na Figura 7 encontra-se uma ilustração simplificada do método utilizado para a caracterização do conteúdo de compostos fenólicos totais.

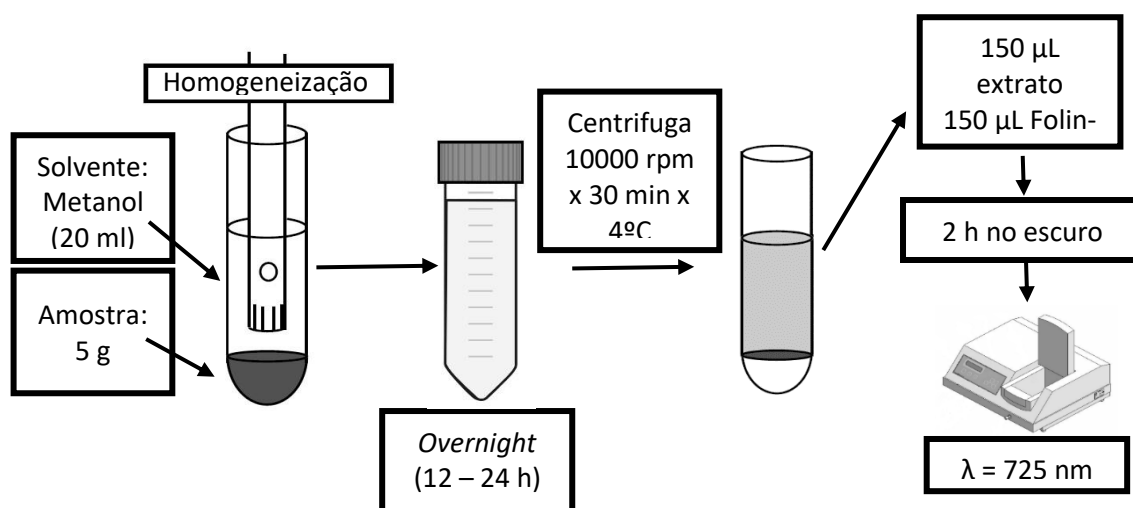


Figura 7 – Ilustração simplificada do método utilizado para a caracterização do conteúdo de compostos fenólicos totais.

5.8.2 Método direto

Outro método utilizado foi o método de Ribereau-Gayon et al. (2000) que consiste numa leitura direta no espectrofotômetro (UNICAM, UV/Vis Spectrometer – UV4) com uma absorvância de 280 nm. A curva de calibração (anexo V) foi traçada com ácido gálico (0, 5, 10, 15, 25, 35, 50 mg / L) em etanol e os resultados finais foram expressos em mg de equivalentes a EAG / 100 g de produto.

5.9 Carotenoides

O teor de carotenoides totais (CCT) foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Talcott & Howard (1999). As amostras foram homogeneizadas em 20 ml de acetona:etanol (1:1, v:v) contendo 200 mg/L de BHT, sendo esta a solução extração. Posteriormente, procedeu-se à lavagem do homogeneizado obtido, por filtração, com solução de extração até que nenhuma alteração de cor adicional fosse observada, perfazendo um volume final de 100 ml. A este extrato adicionou-se 50 ml de n-hexano, permitindo-se a reação por 30 minutos, findo os quais se adicionou 25 ml de água nanopura para permitir a separação de fases. A fase orgânica foi recolhida e submetida a leituras espectrofotométricas com um $\lambda = 470$ nm, num espectrômetro Jasco V-550 UV/VIS – *Spectrophotometer*. Anteriormente, foi efetuada uma curva de padrão utilizado o β -caroteno como referência e o conteúdo de carotenoides totais é expresso em mg de equivalentes a β -caroteno por 100 g de produto. Na Figura 8 encontra-se uma ilustração simplificada do método utilizado para a caracterização do conteúdo de carotenoides totais.

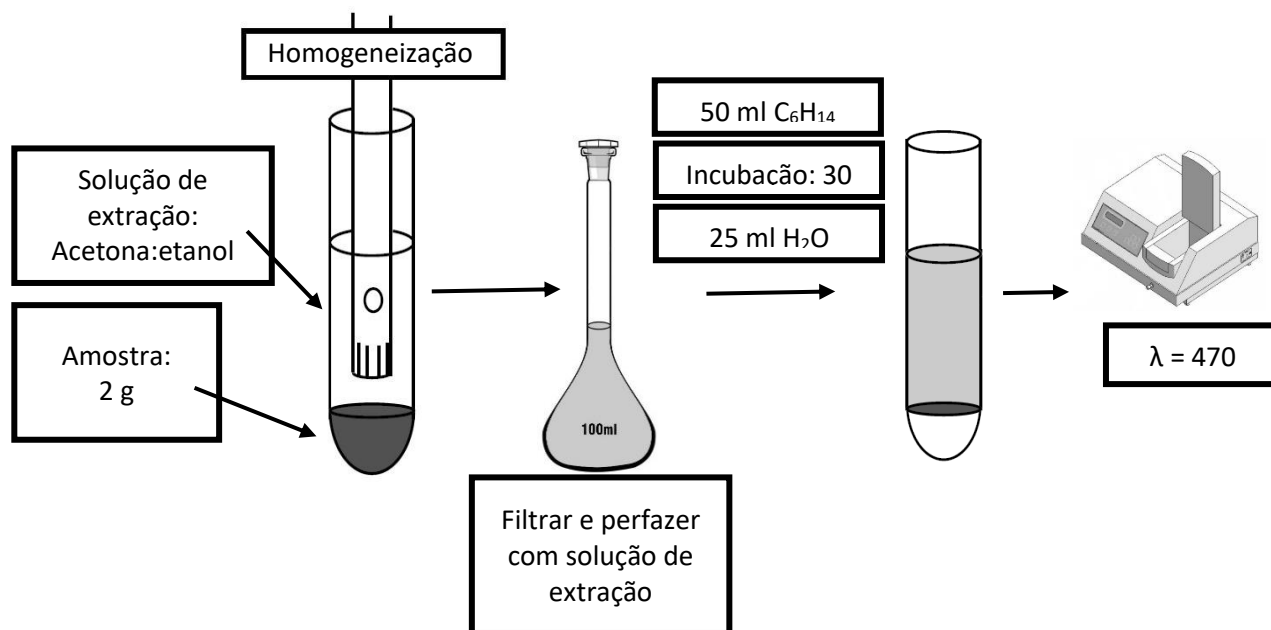


Figura 8 - Ilustração simplificada do método utilizado para a caracterização do conteúdo de carotenoides totais.

6 Determinações microbiológicas

Todas as determinações microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia da Unidade da Tecnologia e Inovação do INIAV, onde as práticas laboratoriais foram realizadas de acordo com EN ISO 7218:2007 e a preparação das amostras e das suas diluições, de acordo com EN ISO 6887:2017.

6.1 Microrganismos a 30°C

A contagem de microrganismos a 30 °C foi realizada segundo a Norma EN ISO 4833:2003. Esta determinação baseia-se no princípio de que cada célula bacteriana presente numa amostra a analisar origina uma colónia individualizada e visível, após inoculação por incorporação e incubação a uma temperatura de 30 °C durante 72 horas em meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA).

6.2 Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras foram determinados de acordo com a Norma EN ISO 21527-1:2008. Em ambos os casos utilizou-se o meio DRBC (*Agar Dichloran Rose Bengal Chlortetracycline*) no qual se transferiu 0,1 mL da suspensão mãe e de cada diluição preparada para a respetiva placa de petri. As placas são incubadas em aerobiose a 25 ± 1°C durante 5 dias.

6.3 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas foram determinadas de acordo com a Norma EN ISO 15214:1998. para esta determinação, foi efetuada uma inoculação de 1 ml das diluições consideradas adequadas em meio MRS (*Man, Rogosa and Sharpe Agar*) por incorporação e com camada dupla. Após incubação a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 ± 4 horas efetuou-se a contagem.

6.4 Bactérias patogénicas

Para determinação de bactérias patogénicas foram selecionadas as bactérias *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Staphylococcus coagulase* positivas e *Listeria monocytogenes*.

- *Enterobacteriaceae*: Norma EN ISO 21528-2:2004 com o meio de cultura VRBG (Violet Red Bile Glucose Ágar).
- *Salmonella* Norma EN ISO 6579:2017 com o meio de cultura Iris.
- *Staphylococcus coagulase* positivas: Norma EN ISO 6888-2:1999 com o meio de cultura RPF (*Rabbit Plasma Fibrinogen*).
- *Listeria monocytogenes*: Norma EN ISO 11290-2:2017 com o meio de cultura Compass *Listeria*.

6.5 Coliformes e *Escherichia coli*

Os coliformes foram determinados de acordo com a Norma EN ISO 4832:2006, e a *E. coli* determinada de acordo com a Norma EN ISO 16641-2:2014.

7 Métodos estatísticos

- O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado com Software Statistica™ versão 8.0 (StatSoft Inc., 2007), por análise de variância (ANOVA), sendo utilizado o teste Tukey ($p < 0,5$) para separação de médias.
- Nos estudos de otimização (metodologia de superfície de resposta) para cada variável resposta (Y) em estudo os resultados foram analisados utilizando o modelo empírico de regressão polinomial quadrático representado na equação 2.

$$(Eq. 2) \quad Y = b_0 + b_1X_1 + b_{11}X_1^2 + b_2X_2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

em que Y corresponde à variável dependente; X_1 e X_2 às variáveis independentes 1 e 2; b_n os coeficientes de regressão.

- A análise de classificação hierárquica e a análise de componentes principais foram efetuadas com o Software Statistica™ versão 8.0 (StatSoft Inc., 2007). O

processo de agrupamento da análise de classificação hierárquica (*cluster*) envolveu três etapas: padronização de dados; avaliação de uma medida de dissimilaridade entre amostras; e o uso de uma técnica de agrupamento. Este agrupamento é representado por um dendograma. Na análise de componentes principais (PCA), todas as variáveis foram centradas e padronizadas, originando uma matriz de correlação. Para cada fator do PCA, foi calculado o valor para cada amostra com uma combinação linear para cada variável. Quando a análise multivariada acumula uma percentagem significativa das informações originais, acima de 70%, é considerado suficiente para definir um bom modelo para fins qualitativos (Larrigaudière *et al.*, 2004).

8 Procedimentos de preparação das amostras de subprodutos

Numa ótica de avaliar a situação real de laboração, os diferentes subprodutos (A, B e C), foram recolhidos dos respetivos palotes de plástico e, transportadas em caixas térmicas até ao laboratório num período inferior a 2h.

À receção no laboratório, foram constituídas aleatoriamente 3 amostras por cada categoria de subprodutos. De seguida, foram imediatamente congeladas (temperatura de -80 °C) e mantidas nestas condições até serem analisadas. Após descongelação *overnight*, as amostras foram avaliadas face ao protocolo analítico estipulado em cada uma das três fases do estudo.

III – TRABALHO EXPERIMENTAL

A valorização de subprodutos industriais constitui uma aposta de futuro, baseada no princípio de sustentabilidade, enquanto contribui para desenvolvimento económico das empresas e para a diminuição dos impactos ambientais. Neste enquadramento, o objetivo geral deste trabalho visou quantificar e caracterizar o potencial bioativo de subprodutos provenientes de uma indústria de sumos. Os tipos de valorização centraram-se em duas hipóteses: considerá-los como potenciais matrizes para a recuperação de compostos bioativos de interesse e/ou utilizá-los enquanto matérias-primas no fabrico de ingredientes alimentares.

A unidade industrial, em análise, produz diferentes formulações de sumos naturais, a partir de diversas misturas de hortofrutícolas, cuja produção é variável ao longo do ano, em função da sazonalidade dos hortofrutícolas (HF) e/ou de estratégias comerciais em função do mercado.

O trabalho experimental incluiu 3 fases:

- **Fase I: Identificação e quantificação dos subprodutos na unidade industrial** - Levantamento documental dos quantitativos gerados na empresa, com base na respetiva homogeneidade composicional, com o intuito de definir categorias de subprodutos representativos. Nesta fase foi igualmente considerado o balanço de perdas associada a cada categoria.
- **Fase II: Caracterização composicional das categorias de subprodutos representativos** - Avaliação composicional detalhada (parâmetros físico-químicos, bioquímicos e microbiológicos) no pós fabrico, em quatro datas ao longo do ano (fevereiro, abril, junho e agosto).
- **Fase III: Valorização da categoria de subprodutos de maçã** - Avaliação das condições do processo de extração de compostos fenólicos (natureza do solvente, proporção material: solvente) na categoria de subprodutos indicada pela empresa. Nesta fase, foi ainda realizado um estudo preliminar de avaliação do subproduto de maçã na produção de um ingrediente alimentar.

9 FASE I: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS SUBPRODUTOS NA UNIDADE INDUSTRIAL

9.1 Caracterização geral do processo produtivo

A atividade económica da empresa abrange a comercialização de frutos em natureza e a produção de sumos, para o mercado nacional e internacional, assim como a comercialização de produtos hortofrutícolas em lojas próprias. Apresenta-se o diagrama geral de processamento de sumos (Figura 9) com identificação das principais operações do processo produtivo, notificando igualmente as fases que originam subprodutos. Ao nível da operação de Seleção / Descasque, são rejeitadas matérias-primas não conformes (eg. podridões visíveis) incluindo matéria vegetal não edível (cascas, ramas e pedúnculos). Segundo informações obtidas na empresa, a contabilização destas perdas é muito variável, de 2 a 50%, em função do tipo de HF utilizado. Na operação de extração a frio, é onde são contabilizadas as perdas mais significativas, podendo ser estimada uma média cerca de 37%. Estes subprodutos são constituídos maioritariamente por sementes, cascas e polpas prensadas. Também nesta situação o valor das perdas é dependente dos tipos de HF incluídos nas formulações.

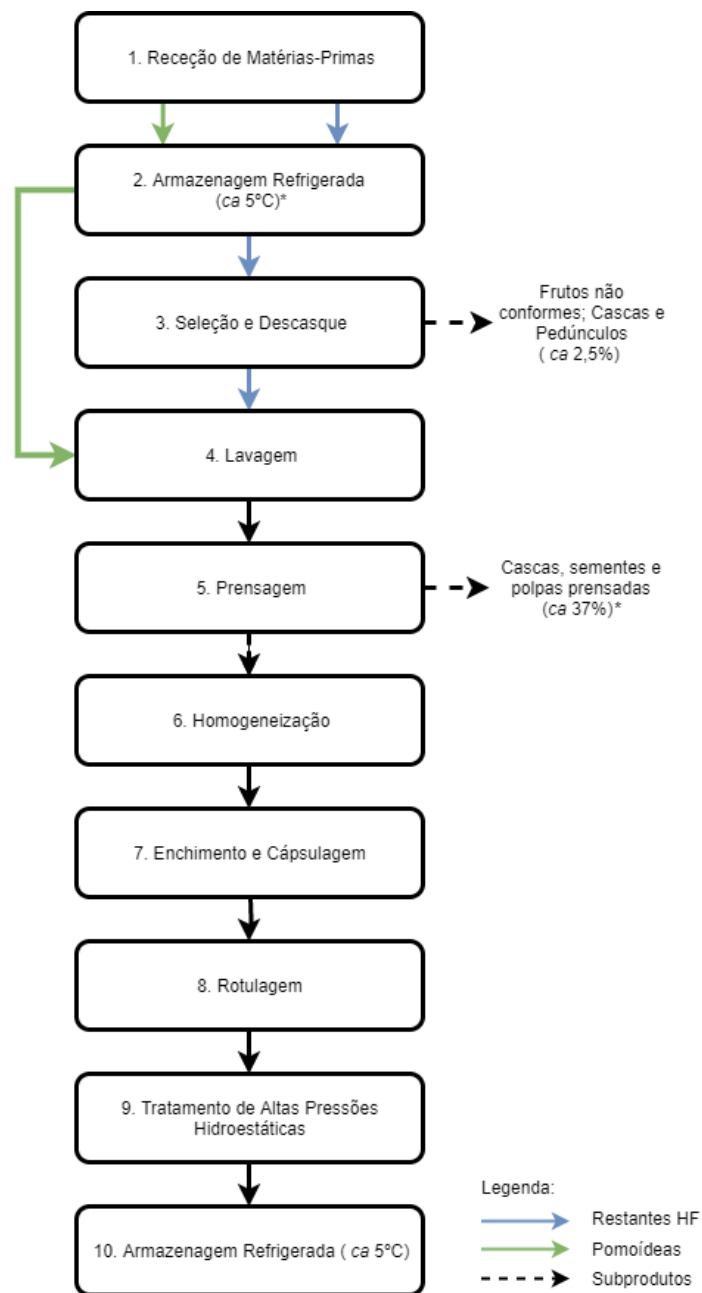


Figura 9 – Diagrama geral de processamento do sumo. *Depende da matéria-prima a ser utilizada.

Descrição das operações unitárias referidas no diagrama geral de processamento de sumo, representado na Figura 9:

- a) Receção de matérias-primas:** Realização de um controlo ao estado higienosanitário, onde é retirada uma amostra para análise em laboratório (°Brix, pH e aspeto visual), caso apresentem uma percentagem de produto não

conforme superior aos critérios mínimos de aceitação admitidos pela empresa, estes são devolvidos ao fornecedor.

- b) Armazenagem refrigerada:** Aquando a receção das matérias-primas, é criado um lote interno de forma a garantir um processo de rastreabilidade e procede-se ao armazenamento da mesma. A refrigeração (0 – 5°C) visa garantir a manutenção da turgescência dos tecidos vegetais, bem como minimizar as perdas vitamínicas de forma a assegurar a qualidade das matérias-primas.
- c) Seleção e descasque:** Alguns produtos podem sofrer apenas corte e retirada de frações que possam influenciar negativamente o produto final, tais como beterraba, cenoura, alface e o aipo. Outros produtos são previamente descascados, tal como o abacate, a romã e o ananás. Posteriormente, seguem para uma lavagem.
- d) Lavagem:** No caso das maçãs e laranjas, o processo de fabrico do sumo é iniciado com a operação de lavagem, que são colocadas no tanque de lavagem e são transportadas por tapete rolante para a zona de produção, nessa altura são seleccionadas e retiradas da linha os produtos que não apresentem as características definidas para entrada em produção. De seguida passam por uma zona de escovas e chuveiro, de forma a remover partículas mais difíceis.
- e) Prensagem:** Nesta fase os produtos são triturados e prensados na tela, exceto os citrinos, que são extraídos num equipamento apropriado para estes.
- f) Homogeneização:** Após a extração dos produtos, são homogeneizados de forma a obter-se um produto com uma textura bem homogénea.
- g) Enchimento e cápsulagem:** O sumo segue para a linha de enchimento onde é engarrafado, em garrafas de polietileno, e capsulado. Nesta linha, as garrafas são avaliadas de acordo com a presença ou ausência de metais, passando pelo detetor de metais
- h) Rotulagem:** Posteriormente as garrafas são rotuladas e estão prontas para serem transportadas para o tratamento de altas pressões hidrostáticas.
- i) Tratamento de altas pressões hidrostáticas:** Neste tratamento, ocorre uma pasteurização, permitindo preservar os alimentos com efeitos mínimos no sabor, textura e nas características nutricionais.
- j) Armazenagem refrigerada:** Após tratamento, o produto é transportado diretamente para a zona de embalagem, ou são armazenadas por um curto período a 5°C.

9.2 Quantificação dos subprodutos na unidade industrial

Na ótica da valorização de subprodutos é importante assinalar que a empresa realiza a segregação de subprodutos, por categorias. Neste sentido, existem três linhas de processamento distintas, em paralelo, dedicadas à laboração de determinados grupos de matérias-primas. Assim a recolha, a seleção e expedição de subprodutos, é realizada separadamente dando origem às diferentes categorias. As linhas de produção, alocadas no interior da fábrica, descarregam os subprodutos em tapetes (ao nível da operação de extração) para o exterior da fábrica.

Na empresa, são consideradas, quatro categorias de subprodutos, com expressão quantitativa: “Laranja”, “Maçã”, “Maçã / Cenoura” e “Outros”. Esta separação baseia-se no tipo de formulações em laboração que proveem de três linhas de processamento, sendo que uma das linhas dá origem a dois tipos subprodutos (“Maçã”, “Maçã / Cenoura”). Nesta última é efetuada a substituição dos tanques de recolha em cada uma das situações. Assim, a designação dada aos subprodutos prende-se com o prevalecimento do tipo de HF utilizado na formulação, por ex. na linha de processamento reservada aos citrinos o fruto que predomina é a laranja. Na categoria “Outros”, são incluídos uma diversidade de hortofrutícolas, nomeadamente, hortelã, alface, aipo, entre outros na dependência do tipo de formulações produzidas.

Numa primeira fase, os subprodutos são descarregados diretamente para palotes localizados no exterior da unidade fabril (Figura 10) e, acondicionados temporariamente nos mesmos até ficarem cheios. Numa segunda fase, os palotes completos são transferidos (empilhadores) para a área dedicada à gestão de subprodutos, designada por armazenagem e expedição.



Figura 10 – Palotes para acondicionamento dos resíduos por categorias.

De forma a avaliar e quantificar os subprodutos produzidos na unidade industrial, efetuou-se a análise do registo documental de produção relativo ao período: outubro de 2017 a maio de 2018 (excetuando o período de junho a setembro) (Figura 11) estimando-se as quantidades de desperdício gerado, em toneladas (t) e por categoria e mês.

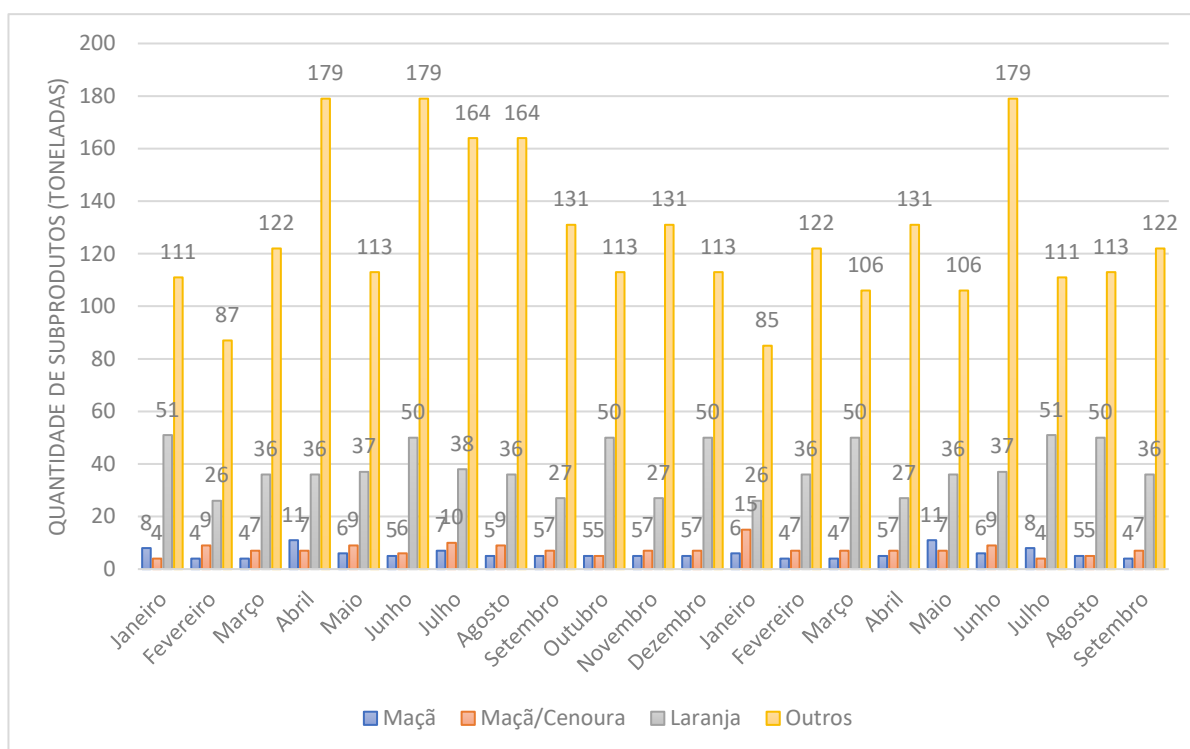


Figura 11 – Estimativa de quantitativos subprodutos gerados, em toneladas, por categoria e por mês.

Analisando os montantes (t) entre as diferentes categorias de subprodutos, verifica-se que a categoria “Outros” é a mais expressiva, alcançando em média valores de 128 ton/mês, o que representa mais de 80% do total de subprodutos gerados. Estes subprodutos são constituídos por diferentes estruturas vegetais (talos, caules e polpa de frutos) de diferentes tipos de hortofrutícolas.

O facto desta categoria incluir matéria vegetal de natureza muito diversificada reflete-se numa grande heterogeneidade composicional. Acresce que os montantes mensais são muito variáveis ao longo do ano, com variações que alcançaram o dobro, 179 t (nos meses de junho e abril de 2017) versus 85 t (janeiro de 2018). Por motivos de heterogeneidade de composição, esta categoria não foi considerada neste estudo.

Na categoria “Laranja” também se verificam variações mensais acentuadas com diferenças de dobro, 51 t (janeiro de 2017 e julho de 2018) vs 24 t (fevereiro de 2017 e janeiro de 2018). No entanto, nas categorias “Maçã” e “Maçã/Cenoura”, as variações mensais foram relativamente constantes ao longo do ano. Estas três categorias são constituídas maioritariamente por cascas, sementes e polpa de HF prensados. Uma das razões que justifica os elevados montantes da categoria “Laranja” face às categorias “Maçã” e

“Maçã/Cenoura” prende-se, em parte, ao fato de que a fração rejeitada deste fruto é muito maior, representando, segundo Li *et al.* (2006) cerca de 66 %. No caso da maçã, o desperdício é menor, cerca de 11% segundo o mesmo autor.

Na figura 12, apresentam-se os registos fotográficos das diferentes categorias resultantes da produção de diferentes formulações de sumo.

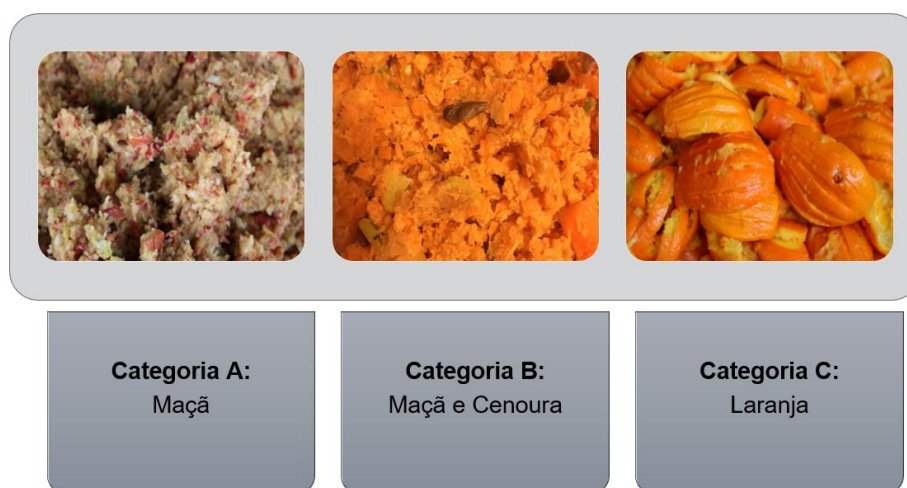


Figura 12 – Aspeto geral das diferentes categorias de subprodutos (A, B e C).

Na Tabela 7, apresenta-se para cada categoria (A, B e C) os montantes anuais gerados, a quantidade média mensal e o grupo de compostos bioativos preponderantes.

Tabela 7 - Identificação das categorias dos subprodutos e do composto bioativo preponderante.

Categoria de subprodutos	Quantidade anual / ton	Quantidade média mensal / ton; (X ± DP)	Composto bioativo alvo
A – Maçã	70	6 ± 2	Fenólicos
B - Maçã e Cenoura	87	7 ± 2	Carotenoides
C – Laranja	464	39 ± 9	Óleo essenciais

Considerando as três categorias (A,B e C), os subprodutos “Laranja” representam mais de 70% do subprodutos gerados, seguindo-se as categorias “Maçã e Cenoura” e “Maçã” com 10 e 16%, respetivamente.

9.3 Considerações intercalares

- Na empresa, foram identificadas 3 categorias de subprodutos com potencial interesse de valorização (A, B, C) cujos montantes médios produzidos foram de 6, 7 e 39 toneladas, por mês.
- Os montantes de subprodutos gerados, com exceção da categoria “Laranja” são relativamente reduzidos para que possam justificar investimento próprio para serem valorizados na própria empresa.
- A definição das potenciais vias de valorização dos resíduos atende à composição em fitoquímicos de interesse relevante em cada categoria (compostos bioativos alvo), mas também ao juízo da respetiva perecibilidade. De fato, os compostos bioativos degradam-se rapidamente através de diferentes vias, oxidativa e microbiana, tendo em conta o elevado teor de água, nível de contaminação microbiológica e grau de maceração dos tecidos vegetais.
- A definição das rotas de valorização implica a caracterização composicional detalhada de cada categoria e a avaliação da respetiva estabilidade (condições de armazenagem).
- A empresa revelou interesse particular na valorização das categorias de subprodutos “Maçã”, e “Maçã / Cenoura” dada a importância da diversificada composição fenólica (natureza antioxidante), da maçã. As variedades mais vulgarmente utilizadas nas formulações são: Casa Nova, Golden Delicious, Granny Smith, Jonagored, Reineta, Gala e Starking.

10 FASE II: CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL DAS CATEGORIAS DE SUBPRODUTOS

10.1 pH, TSS, cidez Titulável e Teor de Humidade,

Na Tabela 8, são apresentados os valores médios de pH, TSS (°Brix), acidez titulável (AT) (g ácido málico/ 100 g) e teor de humidade (%) das amostras (A,B e C), relativos a quatro datas de recolha (fevereiro, abril, junho e agosto).

De acordo com a análise estatística dos resultados de pH, verifica-se que quer o tipo de subproduto quer as datas de recolha, tiveram uma influência ($p < 0,05$) na variação destes valores (Anexo I), tendo o tipo de subproduto um efeito superior face à data de recolha ($F=93,16$ vs. $F=31,30$, respetivamente). No entanto, atendendo a que acréscimos de pH

inferiores a 0,5 unidades têm pouco significado fisiológico, as variações verificadas entre datas, para cada subproduto, podem ser consideradas com efeito marginal.

Tabela 8 - Valores médios (\pm DP) dos parâmetros de pH, TSS, AT e TH, nas diferentes categorias de subprodutos (A, B e C).

Amostra	Mês	pH	AT (g de ácido málico / 100 g)	TSS (°Brix)	TH (%)
A Maçã	Fev	4,2 \pm 0,1	0,18 \pm 0,06	6,8 \pm 0,4	87 \pm 0,0
	Abr	5,0 \pm 0,0	0,14 \pm 0,02	6,9 \pm 0,7	83 \pm 0,0
	Jun	4,8 \pm 0,2	0,18 \pm 0,06	6,3 \pm 0,8	86 \pm 0,0
	Ago	4,6 \pm 0,1	0,14 \pm 0,01	8,3 \pm 1,0	76 \pm 0,0
B Maçã/Cenoura	Fev	5,2 \pm 0,1	0,12 \pm 0,02	5,8 \pm 0,4	87 \pm 0,0
	Abr	5,9 \pm 0,2	0,08 \pm 0,02	7,7 \pm 0,5	82 \pm 0,0
	Jun	5,2 \pm 0,2	0,12 \pm 0,02	4,3 \pm 0,1	89 \pm 0,0
	Ago	5,2 \pm 0,4	0,11 \pm 0,03	6,3 \pm 0,8	84 \pm 0,0
C Laranja	Fev	4,3 \pm 0,0	0,23 \pm 0,07	8,6 \pm 0,5	76 \pm 0,0
	Abr	4,7 \pm 0,1	0,25 \pm 0,04	7,6 \pm 0,8	77 \pm 0,0
	Jun	5,1 \pm 0,1	0,23 \pm 0,07	9,3 \pm 0,4	80 \pm 0,0
	Ago	4,7 \pm 0,0	0,25 \pm 0,05	8,3 \pm 0,42	76 \pm 0,0

A ordenação dos valores médios para cada subproduto (independentemente da data de recolha) é de: A = 4,6 \pm 0,3 < C = 4,7 \pm 0,3 < B = 5,3 \pm 0,4. Estes valores situam todas as categorias na gama ácida (<7). As categorias A e C, em torno de pH 5, e categoria B, ligeiramente superior, em torno de 6, com justificação no tipo de matérias-primas que integram as misturas. Maçã e laranja, frutos mais ácidos que a cenoura. O carácter ácido de todos os subprodutos é importante na medida que concorre para a estabilidade microbológica e enzimática dos subprodutos conferindo assim uma maior proteção dos compostos bioativos.

Da mesma forma, verificou-se que relativamente aos valores de TSS, o efeito do tipo de subproduto é superior ao efeito de data de recolha ($F = 45,45$ vs. $F = 5,12$, respetivamente), tendo ambos influência ($p < 0,05$) na variação destes valores (Anexo I). A comparação dos valores médios do TSS relativos às diferentes categorias de subprodutos revelou semelhanças entre as mesmas, onde a categoria B (Maçã/Cenoura) registou os valores mais baixos (de 6 \pm 1,4), seguindo-se a categoria A (Maçã) com o valor intermédio (de 7 \pm 1,0), e por último a categoria C (Laranja) com o valor mais alto (de 8,4 \pm 0,8).

Tendo em conta que para o TSS contribuem um conjunto de substâncias cuja predominância são açúcares solúveis, e que durante o processo de extração estes compostos são extraídos para o sumo, é natural que nos subprodutos os valores de TSS sejam inferiores aos das matérias-primas que lhes deram origem. Assim, o TSS das diferentes categorias de subprodutos é sempre inferior face aos valores característicos das matérias-primas, para a cenoura ca de 8° Brix (Alegria, 2015), para a maçã ca de 11-12 °Brix (Argenta *et al.*, 1994) e para a laranja, na gama de 8,8-14,8 °Brix (Minhas e Sandhu, 2006).

Relativamente aos valores médios de humidade, verificaram-se diferenças ($p < 0,05$) entre subprodutos. Apesar dos elevados teores de água (próximo de 80%), a categoria C (Laranja) foi a que registou valores mais baixos (de 77%), tendo as restantes, sem diferenças entre si, apresentado valores superiores de 86 e de 83%, na categoria B (Maçã/Cenoura) e A (Maçã), respetivamente. O fato da categoria C apresentar valores inferiores de humidade pode ser justificado pela constituição deste subproduto, maioritariamente cascas de laranja.

No caso da acidez titulável, apenas o tipo de subproduto teve influência ($p < 0,05$) nas variações destes valores ($F = 30,52$) (Anexo I). Entre todas as categorias de subprodutos a categoria C (Laranja) foi a que registou os valores mais elevados (de 0,24 g de ácido málico / 100 g), tendo as restantes apresentado valores de 0,16 e 0,11 g de ácido málico / 100 g, para as categorias A (Maçã) e B (Maçã/Cenoura), respetivamente. O valor médio da acidez titulável caracterizado na categoria C é justificado pelo carácter mais ácido da laranja comparativamente à maçã e cenoura.

10.2 Atividade antioxidante, Conteúdo Fenólico Total e Conteúdo em Carotenoides Total

Os valores médios de compostos fenólicos totais (CFT), de carotenoides totais (CTT), bem como, da atividade antioxidante (AOx), são apresentados nas figuras 13, 14 e 15, respetivamente.

Analisando a Figura 13, a categoria de subprodutos C (Laranja), com valores de CFT médios de $82 \pm 10,3$ mg EAG.100 g⁻¹ foi, entre todas, a que apresentou os teores mais elevados ($p < 0,05$). A categoria A (Maçã) contabilizou valores de CFT de $55,9 \pm 11,6$ mg EAG.100 g⁻¹, e por último a categoria B (Maçã/Cenoura) com valores de $58,5 \pm 14,9$ mg EAG.100 g⁻¹. De acordo com a análise estatística, verifica-se que quer o tipo de subproduto quer as datas de recolha, tiveram uma influência ($p < 0,05$) na variação destes valores (Anexo II), tendo o tipo de subproduto um efeito superior face à data de recolha ($F = 243,3$ vs. $F = 24,9$, respetivamente).

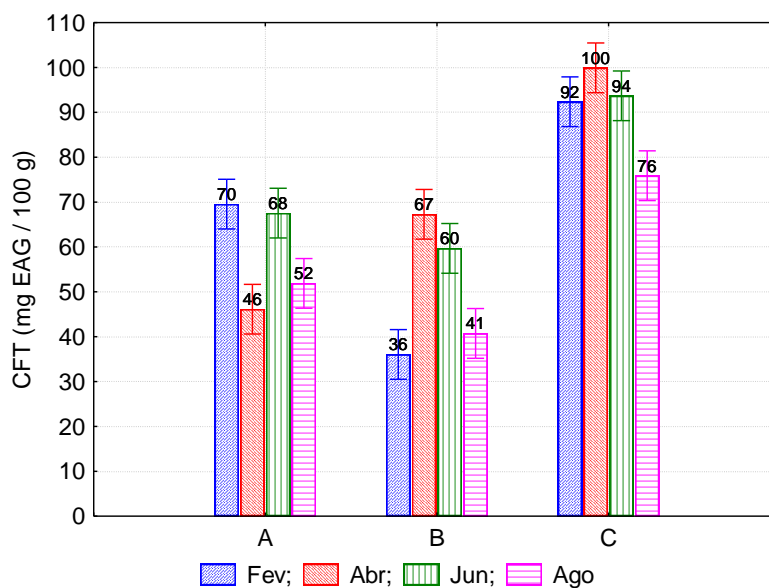


Figura 13 - Conteúdo fenólico total (mg EAG.100 g⁻¹) avaliado nas diferentes categorias de subprodutos [Categoria A (Maçã); Categoria B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).

A quantificação de CFT nas amostras da categoria C pode ter sido influenciada pelos elevados teores de ácido ascórbico presentes, e em consequência, os valores médios obtidos serem sobrevalorizados. De facto, nesta técnica, o ácido ascórbico não sendo um fenólico, participa tal como estes, na redução do reagente *Folin-Ciocalteu* (Ghafar *et al.*, 2010). As categorias A e B (ambas com maçã na sua constituição), apresentaram CFT médios inferiores face à categoria C e semelhantes entre si ($p > 0,05$).

A ordenação ($A \cong B < C$) é concordante com os teores de compostos fenólicos expectáveis face aos valores característicos das matérias-primas que entram na respetiva composição. Alguns valores de compostos fenólicos totais referenciados na literatura indicam para a maçã, gamas de variação de 58,1 a 73,9 mg EAG / 100 g (Fu *et al.*, 2011), para a cenoura de 45 mg EAG.100 g⁻¹ (Surjadinata & Cisneros-Zevallos, 2012), e para a laranja (ca 77,23 mg EAG / 100 g) (Fu *et al.*, 2011). No entanto, as gamas variação anteriormente mencionadas são muito alargadas devido à grande variabilidade de teores fenólicos dependente da variedade / cultivar de cada espécie.

Na Figura 14, destaca-se a categoria A (Maçã) como a que apresenta teores em carotenoides totais (CCT) mais baixos ($p < 0,05$), com valores médios de $1,2 \pm 0,5$ mg β -caroteno.100 g⁻¹. Por ordem crescente, segue-se a categoria B (Maçã/Cenoura) com valores médios de $10,7 \pm 5,6$ mg β -caroteno.100 g⁻¹, e por último, os subprodutos da categoria C (Laranja) com valores médios de $11,1 \pm 2,8$ mg β -caroteno.100 g⁻¹. Da mesma forma, nos

valores médios de CCT, o efeito do tipo de subproduto é superior ao efeito de data de recolha ($F = 136,7$ vs. $F = 28,5$, respetivamente), tendo ambos uma influência ($p < 0,05$) na variação destes valores (Anexo II).

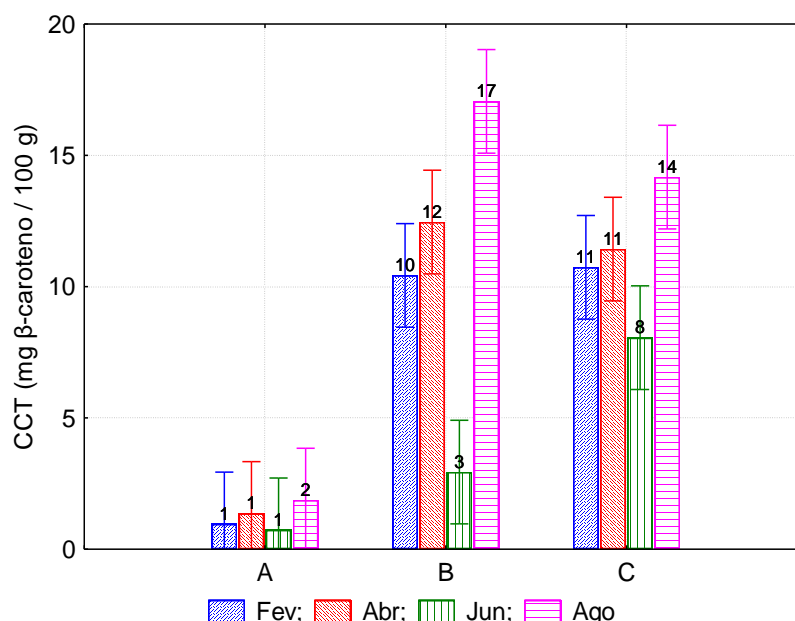


Figura 14 - Conteúdo carotenoides total (mg β -caroteno.100 g⁻¹) avaliado nas diferentes categorias de subprodutos [Categoria A (Maçã); Categoria B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).

A ordenação verificada entre categorias é concordante com os teores de carotenoides presentes nas matérias-primas que integram os diferentes subprodutos. O subproduto B, apresenta na sua constituição cenoura, que é uma importante fonte de α - e β -caroteno.

Noutro estudo de caracterização de subprodutos contendo cenoura (Kuzina, 2014) foram avaliados teores médios de CCT de 11,8 mg eq. β -caroteno.100 g⁻¹, na mesma ordem de grandeza de valores caracterizados neste estudo.

A categoria C também apresenta valores elevados devido ao facto de os citrinos serem igualmente fontes importantes de carotenoides. Por fim, a categoria A contendo apenas maçã na sua constituição apresenta valores baixos em CCT, explicando-se pela sua composição marginal em carotenoides.

De acordo com a análise estatística, verifica-se mais uma vez, que quer o tipo de subproduto quer as datas de recolha, tiveram uma influência ($p < 0,05$) na variação destes valores (Anexo II), tendo o tipo de subproduto um efeito superior face à data de recolha ($F = 41$ vs. $F = 6,3$, respetivamente). Pela Figura 15, constata-se que a categoria C (Laranja) foi, de entre todos os subprodutos, o que contabilizou o valor médio mais elevado ($p < 0,05$), de

AOx de $81,4 \pm 2,1$ g ET.100 g⁻¹. As restantes categorias apresentaram valores semelhantes ($p > 0,05$), tendo sido contabilizado, na categoria A (Maçã) valores de AOx de $61,4 \pm 4,5$ g ET.100 g⁻¹, e na categoria B (Maçã/Cenoura) valores de $69,7 \pm 18,4$ g ET.100 g⁻¹. Este fato pode justificar-se mais uma vez pelos elevados teores de ácido ascórbico na laranja para além da presença de compostos fenólicos com elevada capacidade antioxidante nomeadamente a naringina e naringenina (Andrade, 2019).

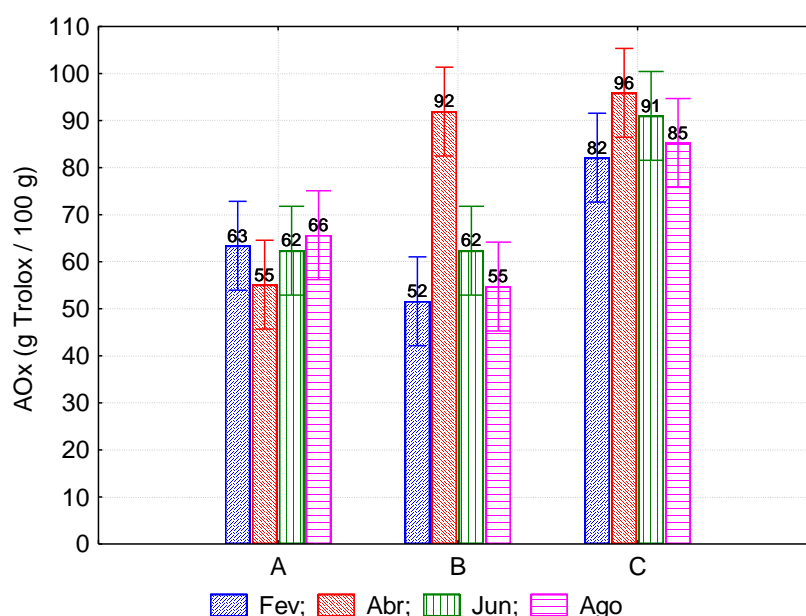


Figura 15 – Capacidade antioxidante relativa à fração hidrofílica (g ET.100 g⁻¹) avaliado nas diferentes categorias de subprodutos [Categoria A (Maçã); Categoria B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).

Verificou-se uma correlação positiva e significativa entre os CFT e a AOx ($0,82$; $r^2 = 0,7$) tal como verificada noutros estudos com diferentes frutos (Sun *et al.*, 2002). Esta relação mostra que a composição fenólica tem um papel significativo na capacidade antioxidante dos subprodutos. Contrariamente, a correlação entre o CCT e a AOx, foi baixa, de $0,35$, $r^2 = 0,1$. baixa. Esta tendência poderá ser justificada pelo fato de não ter sido contabilizada a capacidade antioxidante dos carotenoides da fração lipossolúvel.

10.3 Análise multivariada dos resultados

A análise de classificação hierárquica tem como objetivo o agrupamento de diferentes amostras de um conjunto de dados de forma a que os elementos de cada grupo (cluster) sejam mais parecidos entre si do que com os elementos dos outros grupos.

O conjunto de dados inclui cinco variáveis (TSS, TA, AOx, CFT e CCT) numa evolução de quatro meses (fevereiro, abril, junho e agosto). Tendo como critério de agregação os

resultados das variáveis testadas nas amostras de subprodutos (A, B e C), na Figura 16 encontra-se o dendograma (árvore hierárquica). Em termos de distância euclidiana, o intervalo maior, foi verificado entre a variável CCT face às restantes.

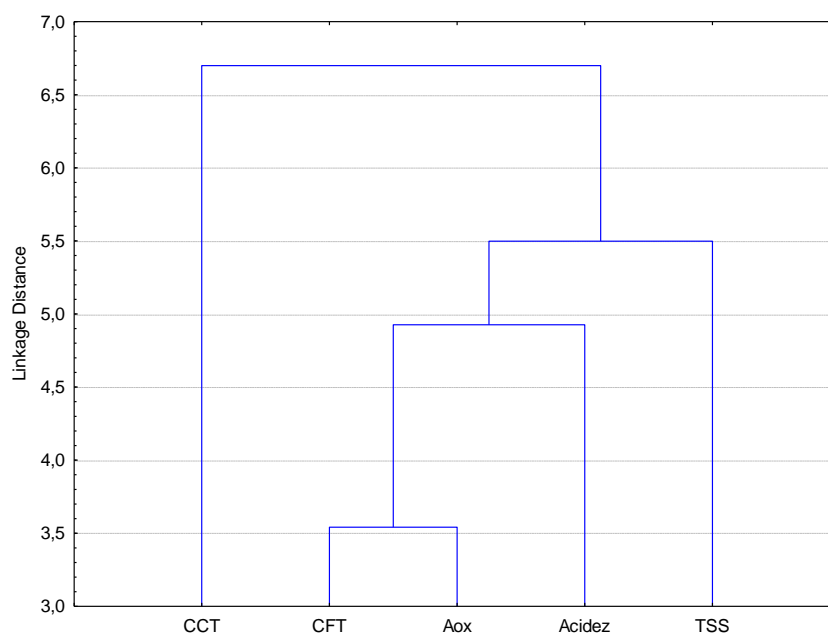


Figura 16 – Dendrograma das 5 variáveis (CCT, CFT, AOx, TA e TSS) testadas nas amostras de subprodutos (A, B e C).

A análise de componentes principais (PCA) permitiu-nos explicar 76,48% da variabilidade dos dados originais, a qual é considerada adequada para definir um bom modelo para fins quantitativos, uma vez que a percentagem significativa da informação original acumulada do fator 1 e o fator 2 é superior a 70% (Anexo III).

O fator 1 representou a maior proporção (ca de 57%) e é explicado pelas variáveis acidez, CFT, TSS e AOx. Como pode ser observado na Figura 17, a projeção dos vetores das variáveis no fator 1 indica que a variável CFT e AOx são as que tiveram maior influência na explicação do mesmo. O fator 2 representou a menor proporção (ca de 20%), e é explicado pela variável CCT.

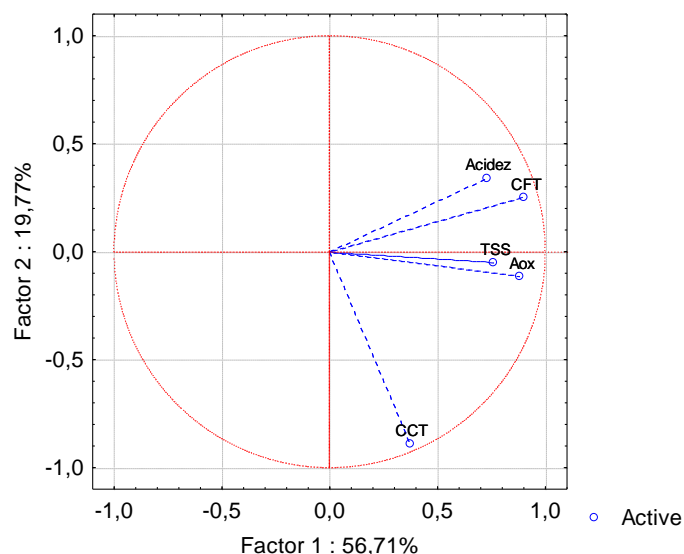


Figura 17 - Projeção espacial da ordenação dos vetores dos atributos analisados nas amostras (A, B e C), no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

A análise da projeção espacial das amostras (dendrograma hierárquico da análise de cluster) é representada na Figura 18. A localização das amostras mais à direita na CP1 (1º e 2º quadrantes) indica para as mesmas, de forma significativa, valores de CFT, AOx, TSS e acidez mais elevados. Por outro lado, a localização das amostras na CP2 reflete valores de CCT mais elevados se localizadas no (2º e 3º quadrantes).

A distinção entre as amostras é claramente visível, enquanto refletiu, de forma geral, os agrupamentos definidos pelas diferentes categorias de subprodutos (*cut off* 5 e 5,5). Na primeira separação assinalada (*cut off* 5,5), ocorre entre as categorias A e B, face à categoria C (incluindo algumas amostras de B). Os subprodutos com maçã e maçã cenoura, apresentam menores teores de CFT e de AOx, bem como apresentam menor acidez e TSS, do que os subprodutos da categoria C (laranja). Num nível inferior (*cut off* 5,0), verifica-se a separação das categorias A da B, determinada pelo CCT, já que a última tem na sua composição cenoura. Ao mesmo nível verifica-se uma subdivisão na categoria C, em que surge um grupo que reúne todas as amostras C separado de algumas amostras B. Esta separação determinada sobretudo pela CP2, indica para a categoria B teores de CCT mais elevados (mais uma vez justificados pela presença de cenoura).

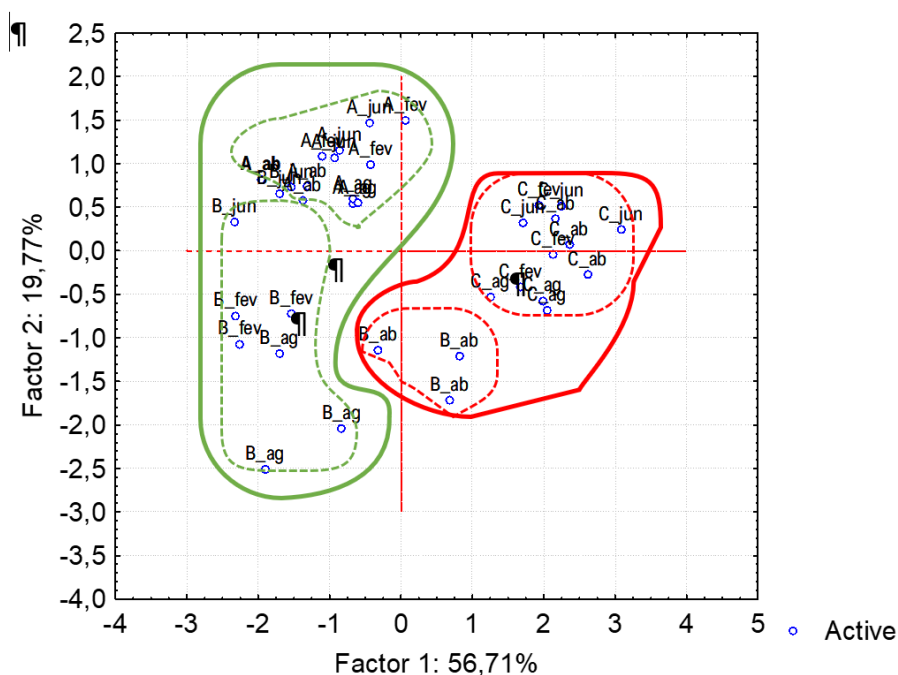


Figura 18 - Projeção espacial das categorias (A, B e C) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais

10.4 Avaliação da contaminação microbiológica

Nas Figuras de 19 a 21, apresentam-se, respetivamente, os valores médios relativos às contagens de Microrganismos a 30°C, Bolores e Leveduras e, Bactérias Lácticas, e na Tabela 5 estão reunidos os resultados referentes aos Coliformes, *E. coli* e bactérias patogénicas das amostras de subprodutos (Maçã (A); Maçã/ Cenoura (B) e, Laranja (C)), recolhidas no processo fabril em quatro datas (fevereiro, abril, junho e agosto).

Microrganismos a 30°C

Da Figura 19, constata-se que as contagens médias de microrganismos a 30°C variaram, em todos os tipos de amostras e datas, entre 4,4 a 6,2 LogUFC / g, com exceção da amostra B analisada em agosto (8,3 LogUFC / g). Este valor elevado, sem explicação aparente, poderia ter justificação em condições atmosféricas particulares do mês de agosto (ex. temperatura elevada). No entanto, as condições ambientais não registaram alterações evidentes e a ter ocorrido qualquer efeito associado, o mesmo não se manifestou nas restantes amostras.

A variação máxima entre a contaminação média, para todos os tipos de amostras, foi sempre inferior a 2 ciclos Log (1,8; 0,1 e 1,0 para A, B e C, respetivamente) não expressando

qualquer tendência entre as datas analisadas. Esta variações podem, assim, ser atribuídas à variabilidade de contaminação das matérias-primas.

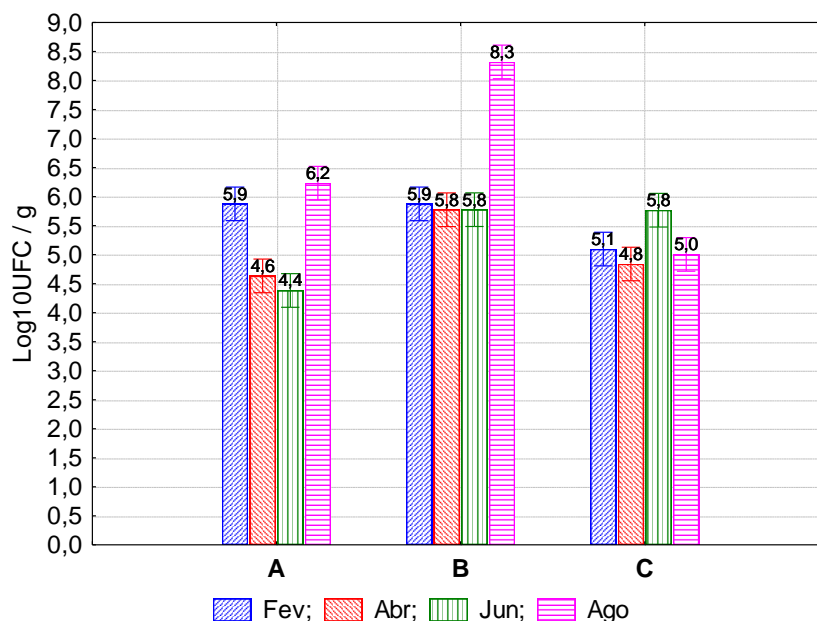


Figura 19 – Contagem de microrganismos a 30°C (Log UFC / g) nas diferentes categorias de subprodutos [A (Maçã); B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).

Bolores e Leveduras

As contagens para o grupo de Bolores e Leveduras (Figura 20), revelam níveis de contaminação semelhantes entre as diferentes categorias nas datas analisadas, na ordem de 5 LogUFC / g e, em que as variações máximas não excederam 1,5 ciclos Log. Neste caso também não se evidencia qualquer tendência dos níveis obtidos ao longo das 4 datas analisadas.

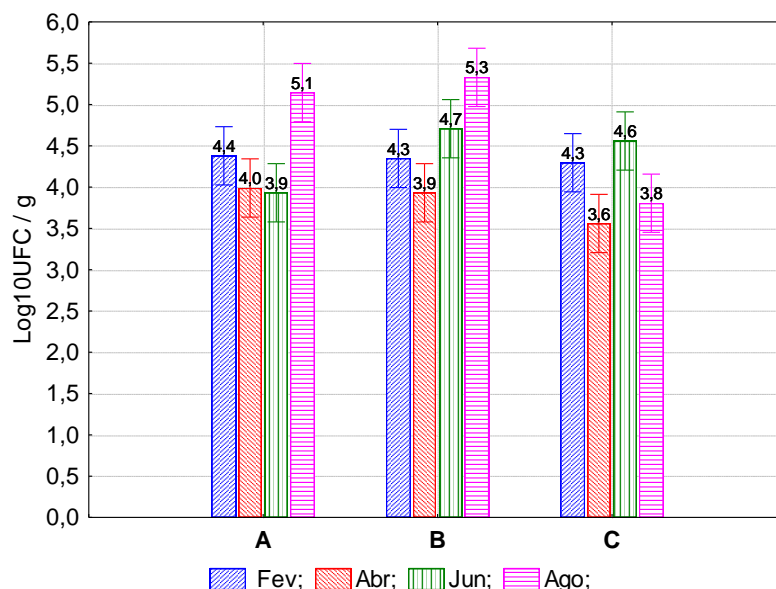


Figura 20 – Contagem de bolores e leveduras (Log UFC / g) nas diferentes categorias de subprodutos [A (Maçã); B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).

Bactérias Lácticas

As contagens para o grupo de bactérias Lácticas (Figura 21), revelam níveis de contaminação semelhantes entre as diferentes categorias nas datas analisadas (excetuando a amostra B analisada em agosto 7 LogUFC / g), com valores médios inferiores a 5 LogUFC / g. Para cada tipo de amostra, a variação dos níveis de contaminação é ligeiramente superior face grupos anteriores (amplitude de variação máxima de 2,1 ciclos Log) sem refletir qualquer tendência ao longo das 4 datas analisadas. É interessante observar a semelhança entre as contagens médias dos microrganismos totais e das bactérias lácticas, facto que poderá indiciar a preponderância deste grupo na flora de contaminação destes subprodutos.

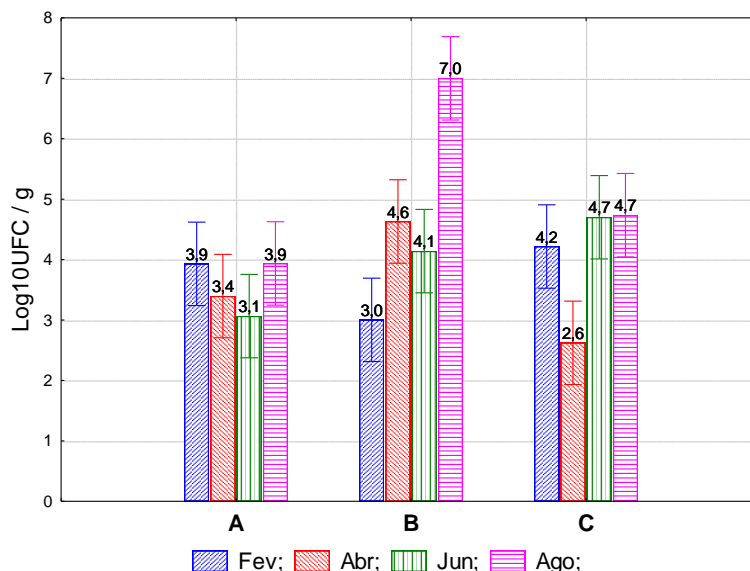


Figura 21 - Contagem microbiológica de bactérias lácticas (Log UFC / g) nas diferentes categorias de subprodutos [A (Maçã); B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês (fevereiro, abril, junho e agosto).

Coliformes, *E. coli* e bactérias patogénicas

Na Tabela 9 apresentam-se os valores médios relativos às contagens de Coliformes, *E. coli* e bactérias patogénicas das amostras de subprodutos (A, B e C) dos meses de fevereiro, abril, junho e agosto.

Tabela 9 - Contagem de Coliformes, *E.coli* e bactérias patogénicas (Log UFC / g) nas diferentes categorias de subprodutos [A (Maçã); B (Maçã/Cenoura); C (Laranja)] por mês

Subproduto	Mês	<i>Enterobactereacea</i>	Coliformes	<i>E.coli</i>	<i>Samonella</i>	<i>Staph. Coagulase +</i>	<i>Listeria</i>
A	Fev	4,6	5,3	<10	Neg.	<10	<10
	Abr	3,6	4,2	<10	Neg.	<10	<10
	Jun	2,4	3,0	<10	Neg.	<10	<10
	Ago	5,4	5,8	<10	Neg.	<10	<10
B	Fev	4,7	5,1	<10	Neg.	<10	<10
	Abr	4,2	5,2	<10	Neg.	<10	<10
	Jun	4,4	4,7	<10	Neg.	<10	<10
	Ago	6,0	6,0	<10	Neg.	<10	<10
C	Fev	3,5	4,5	<10	Neg.	<10	<10
	Abr	3,3	3,6	<10	Neg.	<10	<10
	Jun	3,7	5,3	<10	Neg.	<10	<10
	Ago	3,7	3,6	<10	Neg.	<10	<10

A avaliação da qualidade higiênica das amostras através das contagens de Enterobactereacea e de Coliformes, revelou sempre valores médios inferiores a 6 Log UFC / g. Comparando o nível de contaminação entre as categorias de subprodutos, a categoria B (maçã/cenoura) revelou ser a mais contaminada, tanto ao nível de coliformes como de bactérias *Enterobactereacea* (4,8 Log UFC / g \pm 0,8 e 5,3 Log UFC / g \pm 0,5, respetivamente). De seguida, a categoria A (maçã) com 4,0 Log UFC / g \pm 1,1 de coliformes e 4,6 Log UFC / g \pm 1,1 de bactérias Enterobactereacea. Por último, a categoria C (laranja), com 3,6 Log UFC / g \pm 0,2 de coliformes e 4,3 Log UFC / g \pm 0,8 de bactérias Enterobactereacea. Estes valores correspondem ao nível de contaminação das matérias-primas que lhes deram origem. Mais uma vez não foi identificada qualquer tendência entre os níveis obtidos e as datas analisadas. Estes valores relativamente elevados são expectáveis tendo em conta a origem das matérias-primas e que se tratam de subprodutos e que foram sujeitos durante o processamento a um elevado grau de manipulação das diferentes matérias-primas. Por outro lado, assinala-se que para todas as amostras nas datas analisadas verificou-se a ausência de contaminação patogénica para a *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Listeria monocytogenes*.

10.5 Considerações intercalares

- Da caracterização efetuada (Tabela 10) verificamos que estes subprodutos apresentam elevados teores de humidade (cerca de 82%) o que indica um elevado grau de perecibilidade tendo em conta o grau de trituração em que se apresentam (ruptura das células vegetais). Apresentam carácter ácido (pH, Acidez) dependente das matérias-primas dos quais derivam (maçã, maçã/cenoura e laranja). A quantidade de açúcares presentes demonstrou ser inferior às matérias-primas que integram as misturas e situam-se na gama de 6,0 a 8,5.
- Os subprodutos da categoria C revelaram elevada capacidade antioxidante (61 g ET.100 g⁻¹) associada à presença de CFT demonstrando assim potencialidade como matrizes para extração deste tipo de compostos. Os subprodutos das categorias A e B, associam a sua capacidade antioxidante à presença quer de carotenoides (B) quer de compostos fenólicos (A), podendo ser utilizados como fontes para a respetiva extração.

Tabela 10 - Valores médios dos parâmetros de pH, TSS, AT, Aox, CFT e CCT nas diferentes categorias de subprodutos (A, B e C).

Subproduto	pH	AT (g ácido málico*100 g ⁻¹)	TSS (°Brix)	Humid. (%)	Aox (g ET.100 g ⁻¹)	CFT (mg EAG.100 g ⁻¹)	CCT (mg β- caroteno.100 g ⁻¹)
A (Maçã)	4,7	0,16	7,1	83	61	56	1
B (Maçã/Cenoura)	5,4	0,11	6,0	86	70	59	11
C (Laranja)	4,7	0,24	8,5	77	81	82	11

Os níveis de microrganismos de deterioração avaliados nos subprodutos (A, B e C) (microrganismos totais ≤ 6 LogUFC / g; bolores e leveduras ≤ 5 LogUFC / g; bactérias lácticas < 5 LogUFC / g) e, sobretudo a ausência de patogénicos, revelam condições de utilização aceitáveis na ótica do seu aproveitamento como matérias-primas para processamento alimentar. Por outro lado, os níveis de contaminação avaliados indiciam que estes materiais podem rapidamente entrar em auto fermentação (alcoólica ou láctica) na dependência das condições de armazenagem (ex. temperatura e disponibilidade de oxigénio). Assim, a utilização destes subprodutos como matérias-primas alimentares obrigará a tempos curtos de armazenagem e/ou à imposição de condições de conservação, nomeadamente refrigeração até à sua utilização.

11 FASE III: VALORIZAÇÃO DA CATEGORIA DE SUBPRODUTOS DE MAÇÃ

Com vista a encontrar soluções adequadas para valorizar os subprodutos de maçã (categoria A) descartadas nas linhas de produção de sumo, foram realizados dois ensaios:

- A. Avaliação preliminar das condições de extração de compostos bioativos de interesse com o intuito de considerar este subproduto como matriz para a recuperação de compostos fenólicos.
- B. Avaliação do potencial de utilização do subproduto de maçã liofilizado como ingrediente alimentar.

11.1 Otimização das condições de extração de compostos fenólicos

11.1.1 Delineamento experimental

Com o objetivo de otimizar as condições de extração de compostos fenólicos a partir dos subprodutos de maçã, utilizando como solvente misturas hidro-alcoólicas, foi utilizado um delineamento experimental central composto rotativo com duas variáveis independentes

(tempo e proporção de etanol), através da metodologia de superfície de resposta (RSM). Este delineamento experimental prevê 12 condições de teste, cujas matrizes codificada e decodificada, se apresentam na Tabela 11. As gamas selecionadas para as variáveis independentes foram, para a diluição do solvente etanol (x_1 : 0 – 100%) (mistura etanol: água) e, para o tempo de extração (x_2 : 5 – 45 minutos). As variáveis dependentes consideradas, foram: a quantificação de fenóis totais (CFT) e o teor de sólidos solúveis (TSS). Na preparação das diferentes amostras, à temperatura ambiente, foi utilizado uma massa de subproduto de maçã, de 50 g, utilizando uma proporção, constante, material:solvente de 1:3. A homogeneização foi realizada por agitação magnética, para os diferentes tempos (min) estipulados no delineamento.

Tabela 11 - Matriz codificada e decodificada para as variáveis estudadas

Ensaio	X_1	X_2	Proporção etanol	tempo (min)
12 (C)	0	0	50_50	25
7	0	$-\alpha$	50_50	5
9 (C)	0	0	50_50	25
5	$-\alpha$	0	100_00	25
1	-1	-1	85_15	11
11 (C)	0	0	50_50	25
2	-1	1	85_15	39
4	1	1	15_85	39
6	α	0	00_100	25
10 (C)	0	0	50_50	25
3	1	-1	15_85	11
8	0	A	50_50	45

Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10000 rpm, durante 30 min, 4°C (HERMLE Labortechnik Z 383 K)), tendo os sobrenadantes sido avaliados (CFT, TSS) em triplicado. Para a quantificação dos CFT e TSS, foi utilizado o método direto descrito no ponto 5.8.2 e no ponto 5.1., respetivamente.

Os resultados do CFT e TSS obtidos, de acordo com o delineamento central composto rotativo encontram-se nos anexos V e VI, respetivamente. Na Tabela 12 encontra-se representado o modelo empírico de regressão polinomial quadrático e os coeficientes de regressão (R^2 e R^2_{aj}).

Tabela 12 – Modelos para o CFT e TSS

Variável Dependente	Equação	R ²	R ² aj.
CFT	$3,4677 + 1,2847S^* - 0,0101S^{2*} + 0,8407t - 0,0138t^2 + 0,0001St$	0,85	0,72
TSS	$0,4414 + 0,4222S^* - 0,0021S^{2*} + 0,0230t - 0,0004t^2 + 0,0001St$	0,99	0,99

t = tempo de extração (min.), S = porção do solvente (%), CFT= Conteúdo fenólico total, TSS = Teor Sólidos Solúveis. *Nível de significância (p < 0,05).

Os modelos quadráticos obtidos para ambas as respostas (CFT e TSS) (Tabela 8) apresentaram um bom ajuste tendo em conta os respetivos coeficientes de regressão (R² e R² aj. com valores elevados e próximos entre si). A extração de CFT e de TSS foi influenciada por ambas as variáveis testadas (S, t). No entanto, apenas a variável S apresenta significância estatística (p < 0,05).

Da análise da Figura 22 A, verifica-se que o teor fenólico aumenta quer com o aumento da concentração de etanol quer com o aumento do tempo de extração, até se alcançar um patamar máximo de concentração fenólica de ca de 50 mg EAG.100 g⁻¹, a partir do qual se verifica uma menor eficiência de extração. Dentro deste patamar em que não se verificam acréscimos no CFT selecionámos como condições ótimas: 50% de etanol e 20 min de tempo de extração, no sentido de utilizar condições de extração mais económicas e amigas do ambiente (redução de tempo e etanol). Por outro lado, tempos de extração prolongados podem comprometer a decomposição dos compostos fenólicos por fenómenos de oxidação (Belwal *et al.* 2016), tal como confirmam os resultados do modelo, em que se verifica a perda de eficiência de extração fenólica para condições extremas de concentração de etanol e tempo de extração (S>50% e t>20 min).

A análise da superfície de resposta (Figura 22 B) reflete a tendência de aumento de TSS com o aumento da proporção de etanol utilizada (máximo de 25 °Brix), independentemente do tempo de extração. Esta avaliação é uma medida do índice de extração global, que como era espectável aumenta com a concentração de etanol pois a capacidade de dissolução aumenta.

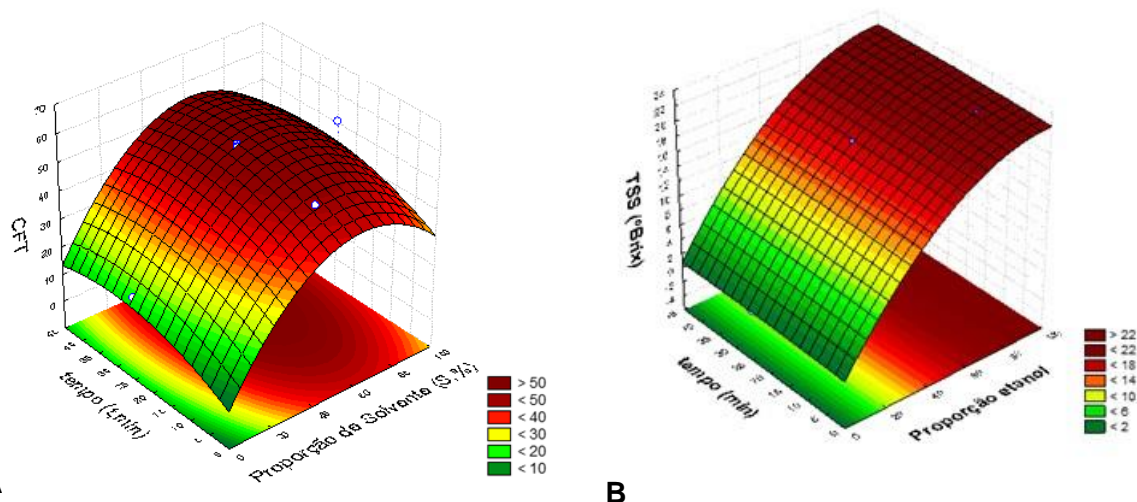


Figura 22 - Superfície de resposta em função da proporção de etanol (X1) (%) e do tempo de extração (X2) (min). (A) Teor de compostos fenólicos (Y1) (mg EAG.100 g⁻¹); (B) Teor de sólidos solúveis (Y1) (°Brix).

11.1.2 Estudo do efeito da agitação e da temperatura na extração

Após otimizadas as condições de extração dos CF (50% de etanol; tempo de extração de 20 min), foi testada a extração assistida por ultrassons (Transsonic 7000 – Elma), em alternativa à extração simples sólido-líquido com agitação magnética (utilizada no ensaio anterior), para iguais condições de tempo de extração e massa de amostra.

Neste ensaio, voltou a testar-se a condição de extração utilizando apenas água destilada (condições de extração mais sustentáveis) com base nos eventuais efeitos acrescidos da agitação ultrassónica na extração dos fenólicos totais

Para cumprir o delineamento [fatorial completa a 2 fatores: tipo de agitação (magnética versus ultrassons) e diluição de solvente (50 % etanol versus 100% de água destilada)] foram constituídas amostras (triplicado), que foram posteriormente acondicionados a dois valores de temperatura (5°C e temperatura ambiente), num total de 8 amostras. A avaliação do efeito da temperatura visou conhecer a estabilidade dos compostos fenólicos neste subproduto para ajuizar qual o tipo de armazenamento mais adequado quando os utilizamos para este fim.

Os resultados da avaliação de CFT, apresentados na figura 23, mostram que a eficiência da extração fenólica a partir do subproduto de maçã, foi significativamente influenciada quer pelo modo de extração como pela natureza do solvente, independentemente do valor de temperatura de acondicionamento.

Os teores de compostos fenólicos avaliados nas amostras extraídas com utilização de 50% de etanol foram sempre significativamente superiores (mais do dobro) face aos obtidos

com utilização de água. Este resultado justifica-se pela maior oportunidade de solubilização dos compostos fenólicos neste solvente.

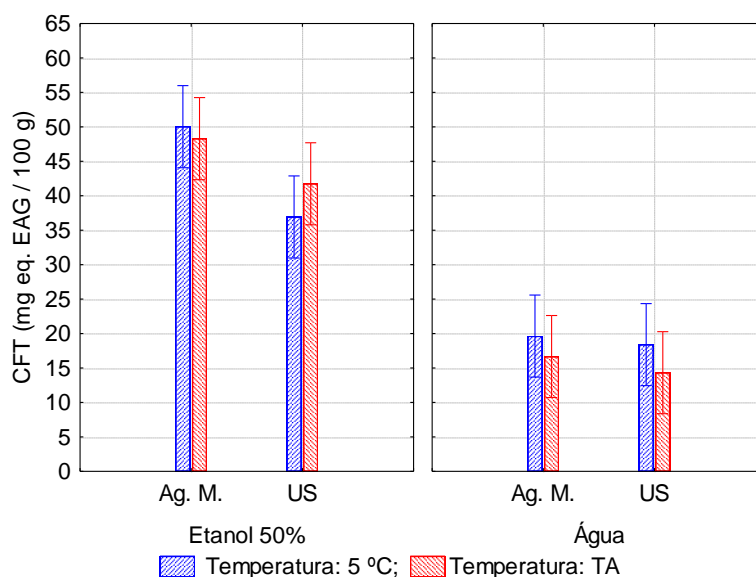


Figura 23 – Efeitos do modo de extração (agitação magnética vs. ultrassons), tipo solvente (etanol 50% vs. água) e temperatura de acondicionamento (5°C e 25°C) no processo de extração fenólica de subproduto de maçã.

Na comparação entre modos de extração, utilizando etanol 50%, verificou-se que as amostras denotaram valores fenólicos ligeiramente superiores ($p > 0,05$) quando extraídas sob agitação magnética. No entanto esta superioridade só foi significativamente diferente ($p < 0,05$) para a temperatura de acondicionamento de 5°C.

11.1.3 Avaliação da estabilidade de compostos fenólicos no subproduto de maçã

Com o objetivo de utilizar os subprodutos de maçã como matrizes de extração de fenólicos é importante conhecer as condições de estabilidade destes compostos durante o armazenamento. Para o efeito estabeleceu-se um ensaio em que, as amostras de subprodutos de maçã rececionadas no próprio dia de processamento (dia 0), foram armazenadas (sacos) em duas condições distintas: 5°C e temperatura ambiente (TA). Ao longo de um período de 5 dias foram retiradas, diariamente, amostras (triplicados) para análise do teor fenólico. A extração foi realizada utilizando as condições previamente otimizadas (etanol 50%, agitação magnética).

A variação dos teores fenólicos avaliados nas amostras, para as duas condições: 5°C e TA (Figura 24), revelam uma tendência de diminuição, independentemente da temperatura de armazenamento. Nas amostras mantidas em refrigeração, essa diminuição só foi

significativa ao dia 3 (cerca de 50%), face aos valores iniciais (dia 0), sem variações adicionais a partir dessa data. Para as amostras mantidas à temperatura ambiente verificou-se um comportamento idêntico, no entanto, a diminuição do teor fenólico foi mais acentuada. Neste caso, os teores fenólicos diminuíram, de forma significativa, logo a partir do dia 2, mantendo a tendência ($p < 0,05$) até ao dia 3 (cerca de 90%). A diminuição dos teores fenólicos (até ao dia 3), independentemente da temperatura, justifica-se por reações oxidativas em que a disrupção celular dos tecidos vegetais e a disponibilidade em oxigénio são condições promotoras de reações enzimáticas, nomeadamente das enzimas polifenoloxidase e peroxidase. Estas oxirredutases participam na oxidação dos compostos fenólicos com diminuição dos respetivos teores e dando origem a polímeros escuros.

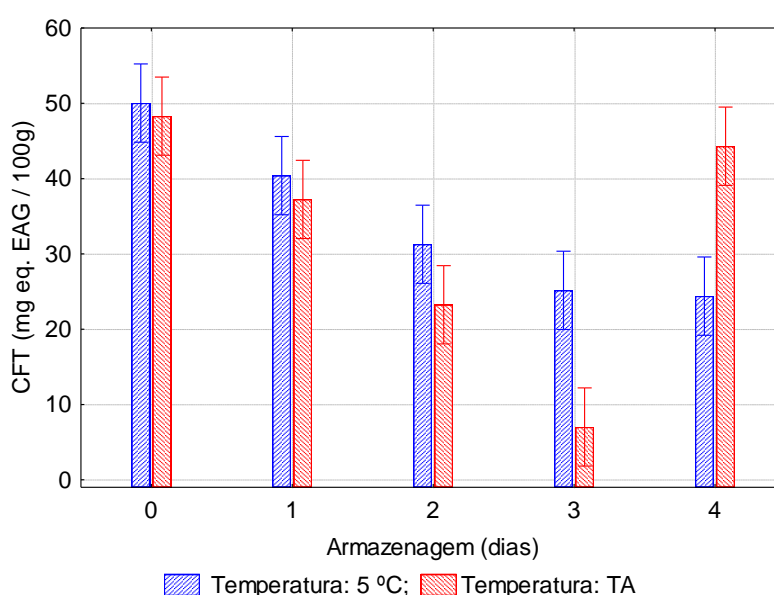


Figura 24 - Avaliação da estabilidade do teor fenólico em amostras de subproduto de maçã: modo de extração , ao longo de 5 dias em duas condições distintas (5°C e temperatura ambiente).

Nas amostras mantidas à temperatura ambiente, verificou-se, a partir do dia 3, a tendência inversa, com recuperação ($p < 0,05$) dos níveis fenólicos iniciais. Esta última tendência pode ser interpretada à luz da indução da síntese fenólica imposta pelo stress corte, tendo em conta o nível de corte dos tecidos nestes subprodutos. Este mecanismo refere-se à ativação da via fenilpropanoide, responsável pela biossíntese fenólica, em que o corte (stress) desencadeia a ativação da enzima fenil alanina amonia liase (PAL) e, em consequência promove a acumulação fenólica (Saltveit, 2000, Cisneros_Zevallos, 2003). O fato deste comportamento apenas se ter verificado à temperatura ambiente poderá ser justificado pelo efeito da refrigeração no atraso das reações bioquímicas, nomeadamente na síntese da PAL, situação que necessitaria de um período de armazenagem mais prolongado.

Tendo em conta estes resultados e a utilização dos subprodutos de maçã como matrizes de extração fenólica poderão ser aconselhadas duas situações: manutenção à temperatura de 5°C se utilizados num período máximo de 2 dias; ou acondicionados à temperatura ambiente se utilizados a partir de 4 dias. No entanto, a oportunidade de desenvolvimento microbiano, sobretudo na condição de temperatura ambiente, terá de ser tida em consideração, uma vez que os fenómenos fermentativos podem desequilibrar o balanço de reações de degradação e de síntese fenólica, anteriormente caracterizados. Neste sentido terão que se desenvolver mais estudos prevendo períodos de armazenagem mais longos.

11.2 Avaliação do potencial de utilização do subproduto de maçã liofilizado

Foi estabelecido um ensaio com o intuito de avaliar o potencial de utilização do subproduto de maçã como ingrediente alimentar. Para o efeito, congelaram-se (-80 °C) amostras de subproduto maçã (A) que foram posteriormente liofilizadas durante 72 horas (liofilizador Telstar LyoQuest). As amostras liofilizadas foram avaliadas (triplicados) face ao seguinte protocolo: Atividade da água (a_w); Conteúdo Fenólico Total (CFT); Capacidade Antioxidante (AOx); Teor de minerais e contagem de microrganismos a 30 °C.

Na Tabela 13, encontram-se os valores médios de CFT, AOx, TSS, a_w e contagens de microrganismos a 30 °C (Mic. 30 °C) no subproduto de maçã (A) liofilizado.

Tabela 13 – Valores médios (\pm DP) dos relativamente ao CFT, AOx, TSS, a_w e Mic. 30 °C na amostra de maçã liofilizada.

Amostra	Conteúdo fenólico total (mg EAG.100 g ⁻¹)	Atividade antioxidante (g ET.100 g ⁻¹)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	Atividade de água	Microrganismos a 30°C (LogUFC.g ⁻¹)
Subprodutos de maçã liofilizado	169,7 \pm 0,4	181,9 \pm 30,9	39,0 \pm 0,9	0,45 \pm 0,05	1,9 \pm 0,2

Subproduto de maçã fresco	55,9 ± 11,6	61,4 ± 4,5	7,1 ± 1,0	0,98 ± 0,02	5,3 ± 0,9
---------------------------------	-------------	------------	-----------	-------------	-----------

Os valores de CFT e AOx avaliados no subproduto de maçã liofilizado (Tabela 9) expressam valores triplos face aos homólogos em fresco (*cf* ponto 2.2.2), traduzindo o efeito de concentração associado à liofilização. Estes valores são interessantes do ponto de vista bioativo na ótica de ingrediente alimentar.

O TSS, de *ca* de 39 °Brix (Tabela 9) expressa igualmente o efeito de concentração e traduz um elevado grau de doçura para este potencial ingrediente.

O valor de a_w de 0,5 (Tabela 9), caracteriza este ingrediente como estável do ponto de vista microbiológico tendo em conta que a maioria dos fungos não se desenvolvem para valores de a_w inferiores a 0,7 e as bactérias para valores inferiores a 0,9 (Brennan, 2006).

A carga microbiana deste ingrediente, de $1,9 \pm 0,2$ LogUFC.g⁻¹, é considerada satisfatória de acordo com o critério indicado por Guilbert *et al.* (2000) para produtos hortofrutícolas secos (< 5 ciclosLog).

Na Tabela 14, são apresentados os valores médios dos teores minerais da amostra de maçã liofilizada.

Tabela 14 - Valores médios (\pm DP) do teor mineral relativo à amostra A, expressos em mg por 100 g de fruto (peso seco).

Amostra	Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn	Mn	S
Maçã	5,6 \pm 0,2	71,5 \pm 2,3	11,4 \pm 1,0	7,4 \pm 0,8	9,3 \pm 1,5	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,0	0,1 \pm 0,0	5,5 \pm 0,8

Os teores avaliados foram, de forma geral, consistentes com valores referenciados na literatura para subprodutos de maçã (Bhushan, *et al.*, 2008). Os subprodutos de maçã demonstram assim constituir uma fonte de minerais, com interesse do ponto de vista nutricional. O potássio é o mineral mais representativo neste subproduto (*ca* 64%), seguindo-se o cálcio e o fósforo, com *ca* de 10% e 9%, respetivamente.

11.3 Considerações intercalares

- Os subprodutos de maçã apresentaram características que favorecem a respetiva valorização tanto por extração de compostos fenólicos como um potencial ingrediente alimentar.
- Com base na metodologia de superfície de resposta (RSM), foi possível estabelecer as condições ótimas de extração de compostos fenólicos dos subprodutos: etanol 50% e 20 minutos de extração. Utilizando 50 gramas de subproduto, com uma proporção material:solvente de 1:3, foi possível obter um máximo de concentração fenólica de *ca* de 50 mg EAG.100 g⁻¹.
- De forma a testar condições de extração mais sustentáveis e eficientes, comparou-se a natureza do solvente e o modo de extração, sendo verificado que estes parâmetros são influenciadores da concentração fenólica obtida. Com a utilização de 50% de etanol verificou-se a obtenção de mais do dobro de CFT face à utilização de água. Na comparação entre modos de extração (etanol 50%), verificou-se uma obtenção de CFT ligeiramente superiores quando extraídas sob agitação magnética face à agitação ultrassónica.
- A variação dos teores fenólicos avaliado nos subprodutos de maçã para as duas condições (5°C e TA), revelam uma tendência de diminuição, independentemente da temperatura de armazenamento. Em suma, para uma ótima utilização destes subprodutos como matrizes de extração fenólica deverá ocorrer uma manutenção à temperatura de 5°C se utilizados num período máximo de 2 dias ou acondicionados à temperatura ambiente se utilizados a partir de 4 dias.
- Da avaliação do potencial de utilização do subproduto de maçã como ingrediente alimentar, verificamos que o subproduto liofilizado apresenta elevados teores de CFT e AOx, sendo 170 mg EAG.100 g⁻¹ e 182 g ET.100 g⁻¹, respetivamente. O TSS, de *ca* de 39 °Brix, traduz elevado grau de doçura para este ingrediente potencial. O valor *a_w* (0,5) e a sua carga microbiana (1,9 ± 0,2 LogUFC / g), caracteriza este ingrediente como estável e satisfatório do ponto de vista microbiológico.

12 CONCLUSÕES FINAIS

Os subprodutos provenientes de uma empresa transformadora de hortofrutícolas apresentaram potencial para a extração de compostos fenólicos e como ingrediente alimentar.

Identificação e quantificação dos subprodutos na unidade industrial

- A empresa transformadora de hortofrutícolas, alvo deste estudo, descarta em média ca de 180 t/mês, justificando-se a aplicação de tecnologias para a respetiva valorização económica.
- Entre as quatro categorias de subprodutos considerados (“Outros”, Laranja, Maçã e Maçã/Cenoura), as mais representativas em termos de volume, foram a categoria “Outros” (128 t/mês) e Laranja (39 t/mês), correspondendo a 71% e 22% do total de subprodutos, respetivamente.
- Os montantes de subprodutos gerados, com exceção da categoria “Laranja” são relativamente reduzidos para que possam justificar investimento tecnológico para a respetiva valorização na própria empresa. No entanto, tal não deve constituir uma limitação tendo que se encontrar soluções em alternativas como por exemplo reunir subprodutos similares a partir de várias empresas e conseguir a escala necessária que o justifique por parte de uma empresa vocacionada para o efeito.

Caracterização composicional das categorias de subprodutos

- A composição de todas as categorias de subprodutos considerados apresentam elevados teores de humidade (cerca de 82%), que aliado à presença de nutrientes e à contaminação microbiológica, confere-lhes uma natureza muito perecível.
- De entre todas as categorias consideradas, a categoria C (Laranja) foi a que demonstrou ser mais promissora enquanto matriz para a recuperação de compostos bioativos antioxidantes, com valores médios de CFT médios de $82 \pm 10,3$ mg EAG.100 g⁻¹, de CCT médios de $11,1 \pm 2,8$ mg β -caroteno.100 g⁻¹ e de AOx $81,4 \pm 2,1$ g ET.100 g⁻¹.
- A nível microbiológico, todas as categorias consideradas, revelam condições de segurança (ausência de patogénicos) o que lhes permite ser utilizadas na ótica de matérias-primas para processamento alimentar.

Valorização da categoria de subprodutos de maçã

- A otimização das condições de extração fenólica através do método sólido líquido foram: a utilização de solvente etanol a 50% sob agitação magnética durante 20 minutos. Nestas condições obtiveram-se teores fenólicos na ordem de 50 mg EAG.100 g⁻¹.
- O subproduto de maçã liofilizado apresenta potencialidades como ingrediente alimentar, tendo-se verificado um elevado potencial bioativo (atividade antioxidante e composição fenólica de AOx - 182 g ET.100 g⁻¹ e, de CFT - 170 mg EAG.100 g⁻¹, respetivamente). Apresenta elevado grau de doçura (TSS, de ca de 39 °Brix) o que pode ser apelativo como ingrediente. Por fim, o valor a_w (0,5) caracteriza níveis de estabilidade microbiano para este produto.

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEP (2011). Manual de Gestão de Resíduos Industriais. Associação Empresarial de Portugal.
- Aguiar, J. (2017). *Determinação de Compostos Bioativos em Frutas e Vegetais Consumidos na Região Autónoma da Madeira*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica Aplicada. Universidade da Madeira. Madeira.
- Alegria, C. (2015). Heat shock and UV-C abiotic stress treatments as alternative tools to promote fresh-cut carrot quality and shelf-life. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Alimentar. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 295 p.
- Aliakbarian, B., Casale, M., Paini, M., Alberto, A., Lanteri, S., & Perego, P. (2014). Production of a novel fermented milk forti fi ed with natural antioxidants and its analysis by NIR spectroscopy. *Food Science and Technology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.037>
- Andrade, L. (2019). Extração e biotransformação de flavonoides a partir de resíduos de industria citrica. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Faculdade de ciências Farmacêuticas de Araraquara. Araraquara.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 755–781. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>
- Argenta, C.; Suzuki, A. (1994). Relação entre teores minerais e freqüência de bitter pit em maçã cv. Gala no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.16, p.267-277.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244.
- Asl, A. H., & Khajenoori, M. (2013). *Subcritical Water Extraction. Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling*.
- Associação Portuguesa de Nutrição (2017). *Colher saber*. E-book nº 45. Porto: Associação Portuguesa de Nutrição.
- Ayala-Zavala, J., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., & González-Aguilar, G. (2010). Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. *Food Science*, 75(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01792.x>

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
- Baeta, M. (2014). *Subprodutos da indústria de hortofrutícolas minimamente processados : caracterização e valorização do potencial bioativo e energético Mónica Isabel Guerreiro Baeta Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Processamento dos A.* Universidade de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia.
- Ball, G. (2004). *Vitamins - Their Role in the Human Body*. London, U.K: Blackwell Publising.
- Barroso, T. (2014). *Alimentos Enriquecidos com Vitaminas e Minerais*. Dissertação para obtenção do grau de mestre. Universidade de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Baxter, H., Harborne, JB., Moss, P. (1998). *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Second Edition: Taylor & Francis, p. 976.
- Benelli, P., Riehl, C. A. S., Smânia, A., Smânia, E. F. A., & Ferreira, S. R. S. (2010). Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *Journal of Supercritical Fluids*, 55(1), 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.08.015>
- Bhushan, S., kalia, K., Sharma, M., Singh, B. (2008). Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*. 28(4). 285-296. <https://doi.org/10.1080/07388550802368895>
- Bond, J., Morrison-Saunders, A. (2011). Re-evaluating Sustainability Assessment: Aligning the vision and the practice. *Environmental Impact Assessment Review*, 31(1), 1–7. [doi:10.1016/j.eiar.2010.01.007](https://doi.org/10.1016/j.eiar.2010.01.007)
- Bora, P., RaEAGe, S., & Abdel-Aal, E. (2019). Effect of incorporation of goji berry by-product on biochemical, physical and sensory properties of selected bakery products. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.123>
- Bouallagui, H., Touhami, Y., Cheikh, R. Ben, & Hamdi, M. (2005). Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes, 40, 989–995. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.03.007>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Bravo, L. (1998). Polyphenols : Chemistry , Dietary Sources , Metabolism , and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Brennan, J. G. (2006). Food Processing Handbook. Weinheim: Weinheim: WILEYVCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp. 85-124.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). *Carotenoids*. Springer Basel AG.
- Çam, M., Erdogan, F., Aslan, D., & Dinc, M. (2013). Enrichment of Functional Properties of Ice Cream with Pomegranate By-products. *Food Chemistry*, 78(10), 1543–1550. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12258>
- Cardoso, A. (2017). *Extração supercrítica do Agastache foeniculum (Lamiaceae) Caracterização dos Extratos e Modelação*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica. Instituto politécnico de Lisboa - Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Lisboa. pp.32.
- Carvalho, A. (2014). *Implementação e validação de um método de pesquisa e quantificação de Vitamina E por HPLC*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa.
- Cisneros-Zevallos, L. (2003). The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool forenhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits andvegetables. *Journal of Food Science*, 68: 1560–1565.
- Coelho, R. (2013). *Otimização da extração sólido- líquido de antioxidantes de subprodutos florestais pelo método de superfície de resposta*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química - Tecnologias de Proteção Ambiental. Instituto Superior de Engenharia do Porto. Porto..
- Combs, G. F., & San Diego, J. (2013). *The Vitamins : Fundamental Aspects in Nutrition and. Journal of the American College of Nutrition* (Vol. 19). Academic Press. <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718917>
- Crespo, E. (2013). *Digestão Anaeróbia de resíduos agroalimentares : Reutilização das frações líquidas e sólidas*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Energia e Bioenergia. Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics : chemistry , bioavailability and effects on health, 26(8), 965–1096. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Cunha, V. (2011). *Lípidos totais e avaliação da interferência do método na análise do perfil*

- dos ácidos gordos. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade em Laboratórios. Instituto Politécnico de Viana do Castelo. Viana do Castelo. pp.15.
- Desobry, S., Netto, F., & Labuza, T. (1998). Preservation of β -Carotene from Carrots. *Food Science and Nutrition*, 38(5), 37–41.
- Djilas, S., Canadanovic-Brunet, J., & Gordana, C. (2009). BY-PRODUCTS OF FRUITS PROCESSING AS A SOURCE OF PHYTOCHEMICALS. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 15(4), 191–202. <https://doi.org/10.2298/CICEQ0904191D>
- El-said, M. M., & Farahat, A. M. (2014). Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with pomegranate peel extracts. *Annals of Agricultural Science*. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2014.11.007>
- Epstein, E. (2011). *Industrial composting - Environmental Engineering and Facilities Management*. CRC Press.
- Ersöz, E., Kınık, Ö., Yerlikaya, O., & Açı, M. (2011). Effect of phenolic compounds on characteristics of strained yoghurts produced from sheep milk. *African Journal of Agricultural Research*, 6(23), 5351–5359. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.1012>
- Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(227–250), 2928–2935. <https://doi.org/10.1109/SMC.2016.7844685>
- Falguera, V., Forns, M., & Ibarz, A. (2012). Short communication Effect of UV-vis irradiation of must on Cabernet Franc and Xarel Æ lo wines chemical quality. *Food Science and Nutrition*, 47(9), 2015–2020. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03059.x>
- Fu, L., Xu, B.-T., Xu, X.-R., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xia, E.-Q., & Li, H.-B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129(2), 345–350. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.079
- Galanakis, C. M. (2015). *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-16046-1>
- Ghafar, M. F. A. et al. (2010). Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from citrus species. *African Journal of Biotechnology*, 9(3), pp. 326-330.
- Gilbert, R.J., de Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C.D., Richards, J., Roberts,

- D., Bolton, F.J. (2000) Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. PHLS Advisory Committee for Food and Dairy Products. *Communicable Disease and Public Health*, 3(3): 163–167.
- Gorinstein, S., Marti, O., Park, Y., Haruenkit, R., Lojek, A., & Milan, C. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74, 309–315.
- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., ... Xia, W. (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.08.012>
- He, L., Zhang, X., Xu, H., Xu, C., Yuan, F., Knez, Ž., ... Gao, Y. (2012). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS + assay. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.03.003>
- Heinz, V., Toepfl, S., & Knorr, D. (2003). Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(2), 167–175. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(03\)00017-1](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00017-1)
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495–2511. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019>
- Herrero, M., Sánchez-Camargo, A. del P., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2015). Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 26–38.
- Instituto Nacional de Estatística (INE). (2010). Estatísticas da Produção Industrial 2008. Lisboa-Portugal.
- Iriondo-DeHond, M., Miguel, E., & Castilho, M. (2018). Byproducts as a Source of Novel Ingredients in Dairy Foods. *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812687-5.22137-0>
- Issar, K., Sharma, P. C., & Gupta, A. (2016). UTILIZATION OF APPLE POMACE IN THE PREPARATION OF FIBER-ENRICHED ACIDOPHILUS YOGHURT. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1–6. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13098>
- Kaderides, K., Papaoikonomou, L., Serafim, M., & Goula, A. M. (2019). Microwave-assisted

- extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 137(January), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>
- Kaur, D., Wani, A. A., Singh, D. P., & Sogi, D. S. (2011). International Journal of Food Properties Shelf Life Enhancement of Butter , Ice- Cream , and Mayonnaise by Addition of Lycopene. *International Journal of Food Properties*, 14(6), 1217–1231. <https://doi.org/10.1080/10942911003637335>
- Kuzina, A. (2014). *Valorização de subprodutos de cenoura. Promoção da componente Bioactiva*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Universidade de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Landrier, J. ., Marcotorchino, J., & Tourniaire, F. (2012). Lipophilic Micronutrients and Adipose Tissue Biology, 4(11), 1622–1649. <https://doi.org/10.3390/nu4111622>
- Larrigaudière, C., Lentheric, I., Puy, J., Pintó, E. (2004). Biochemical characterisation of core browning and brown heart disorder in pear by multivariate analysis. *Postharvest Biology & Technology*, 31:29–39.
- Lastella, G., Testa, C., Cornacchia, G., Notornicola, M., & Voltasio, F. (2002). Anaerobic digestion of semi-solid organic waste : biogas production and its purification. *Energy Conversion & Management*, 43, 63–75.
- Li, B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.019>
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals , antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacogn Review*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.005>
- Luís, Â. (2014). *Pesquisa e Identificação de Compostos Bioativos em Plantas Florestais*. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica Universidade da Beira Interior. Covilhã. pp. 4.

- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., & Rimac Brnčić, S. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science and Technology*, 76(March), 28–37.
- Marinova, D., & Ribarova, F. Ā. (2007). HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 370–374. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.09.007>
- Mineiro, S. (2014). *Fibra Alimentar: composição, métodos e implicações alimentares*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa. pp.11.
- Minhas, K., Sandhu, K. 2006. Handbook of fruits and fruit processing. 1 st edition. America: Blackwell Publishing, 38 p.
- Misra, N. N., Martynenko, A., Chemat, F., Paniwnyk, L., Francisco, J., Jambrak, A. R., ... Reñ, A. (2017). Electrochemistry of External Field Assisted Non- thermal Food Technologies. *Food Science and Nutrition*, 8398(April).
- Mosibo, O. K., Scampicchio, M., Ramezani, M., Morozova, K., & Ferrentino, G. (2018). Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. *Journal of Cleaner Production*, 186, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.165>
- Ohenewa, Y. (2016). *Prodution of biogas from fruit and vegetable wastes*. Kwane Nkrumah University of Science and Technology.
- Paz, R. (2018). *Determinação simultânea, por cromatografia líquida de alta resolução , das vitaminas A , D e E em amostras compostas por diferentes matrizes alimentares*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Lisboa. pp. 9-29.
- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., ... Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137–150.
- Pintado, M., Teixeira, J. (2015). Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado. Boletim de Biotecnologia.
- Plaza, M., Abrahamsson, V., & Turner, C. (2013). Extraction and neoformation of antioxidant compounds by pressurized hot water extraction from apple byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5500–5510. <https://doi.org/10.1021/jf400584f>

- Raimundo, D. (2018). *Estratégias para redução e valorização de co-produtos de uma indústria hortofrutícola*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Universidade de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia. Lisboa
- Ramos, S. (2016). *Desenvolvimento e otimização de extração de antioxidantes de matrizes alimentares por QuEChERS*. Dissertação para obtenção do grau de Meste em Engenharia Química. Instituto Superior de Engenharia do Porto. Porto. pp.5-14.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1996). Review Article. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933–956.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdieu, D. (2000). Handbook of Enology. The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol. 2). West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.: 129-184.
- Rizk, E. M., El-kady, A. T., & El-bialy, A. R. (2014). Charactrization of carotenoids (lyco-red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2014.06.008>
- Rodsamran, P., & Sothornvit, R. (2019). Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*, 28(March 2018), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.017>
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., & Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 0229(96), 402–420.
- Rupasinghe, H. P. V., Wang, L., Huber, G. M., & Pitts, N. L. (2008). Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Chemistry*, 107, 1217–1224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.057>
- Saddozai, A. A., Ahad, K., Safdar, M. N., Kausar, T., Mumtaz, A., & Jabbar, S. (2016). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (Citrus reticulata L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>
- Saltveit, M.E. (2000). Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biology & Technology*, 21: 61-69.
- Samadi, M., Abidin, Z. Z., Yunus, R., Awang Biak, D. R., Yoshida, H., & Lok, E. H. (2017). Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of Aquilaria malaccensis leaves essential oil. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 25(2), 216–222.

- Santos, P. (2014). *Extração e caracterização de extratos de Jatropha gossypifolia L. Avaliação da sua atividade antimicrobiana e antioxidante*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Lisboa. pp.21-29.
- Santos, S. A. O., Villaverde, J. J., Silva, C. M., Neto, C. P., & Silvestre, A. J. D. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from Eucalyptus globulus Labill bark. *Journal of Supercritical Fluids*, 71, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.07.004>
- Santos, V. (2017). *Valorização tecnológica de subprodutos de maçã minimamente processada: preparação e avaliação da funcionalidade de farinha de maçã na substituição de farinha de trigo em bolos tipo “queque”*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto politécnico de Leiria. Peniche.
- Saraç, M., & Dogan, M. (2016). Incorporation of dietary fiber concentrates from fruit and vegetable wastes in butter : effects on physicochemical , textural , and sensory properties. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2637-9>
- Scano, E., Asquer, C., Pistis, A., Ortu, L., Demontis, V., & Cocco, D. (2014). Biogas from anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes : Experimental results on pilot-scale and preliminary performance evaluation of a full-scale power plant. *Energy Conversion and Management*, 77, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2013.09.004>
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., & Ramaswamy, H. S. (2019). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel. *LWT - Food Science and Technology*, 101(November 2018), 342–350.
- Silva, L. (2016). *Contributo para a avaliação da ingestão de carotenoides pela população portuguesa com base na sua determinação analítica em amostras representativas - Efeitos da sazonalidade*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Lisboa. pp.5-14.
- Singh, P. P., & Saldaña, M. D. A. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International*, 44(8), 2452–2458. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.006>
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in Nutrition*, 3(4), 506–516. <https://doi.org/10.3945/an.112.002154.506>
- Stahl, W., & Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 101–107.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.12.006>

- Sudha, M., Indumathi, K., Sumanth, M., Rajarathnam, S., & Shashirekha, M. (2015). Mango pulp fibre waste : characterization and utilization as a bakery product ingredient. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-015-9246-3>
- Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449–7454. doi:10.1021/jf0207530
- Surjadinata, B. B., & Cisneros-Zevallos, L. (2012). Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity. *Food chemistry*, 134(2), 615-624.
- Swain, T., & Hillis, W. (1945). The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Science of Food and Agriculture*, 643(2), 33. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E., & Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.038>
- Talcott, S. T., & Howard, L. R. (1999). Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2109–2115. <https://doi.org/10.1021/jf981134n>
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., & Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals : A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(September), 1089–1099.
- Tchobanoglous, G., & Kreith, F. (2002). *Handbook of solid waste management* (2nd ed.). McGraw-Hill.
- Teixeira, S. (2003). *Determinação de compostos orgânicos de grande valor comercial em extratos vegetais - Estudo de Novas Técnicas de Extração*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente. Instituto Superior De Engenharia Química do Porto. Porto. pp.14-17.
- Valente, D. (2015). *Pesquisa da atividade antioxidante em subprodutos alimentares : conceito de sustentabilidade*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciência da Saúde. Porto. pp.3-9.
- Valente, J. (2015). *Subprodutos Alimentares : Novas Alternativas e Possíveis Aplicações*

Farmacêuticas. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciência da Saúde. Porto. pp.1-9.

Value (2012) - Guia para a seleção das melhores técnicas disponíveis de Valorização na Região do SUDOE. Intercâmbio e transferência tecnológica sobre a valorização de resíduos da indústria de transformados vegetais do SUDOE.

Wijngaard, H. H., Ballay, M., & Brunton, N. (2012). The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids. *Food Chemistry*, 133(4), 1123–1130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.136>

Wognum, P. M. N., Bremmers, H., Trienekens, J. H., Vorst, J. G. A. J. Van Der, & Bloemhof, J. M. (2011). Advanced Engineering Informatics Systems for sustainability and transparency of food supply chains – Current status and challenges. *Advanced Engineering Informatics*, 25(1), 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.aei.2010.06.001>

World comission on enviromental and development (WCED). (1987). *Our common future*. Oxford: Oxford University Press.

Yi, T., Huang, X., Pan, S., & Wang, L. (2014). Physicochemical and functional properties of micronized jincheng orange by-products (*Citrus sinensis* Osbeck) dietary fiber and its application as a fat replacer in yogurt. *Food Science and Nutrition*, 65(5), 565–572. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.898252>

Anexo I

Tabela A1 – Efeito da categoria da amostra (C) e o mês de recolha das mesmas (M) no pH, no teor de sólidos solúveis (TSS), na acidez titulável (TA) e no teor de humidade (TH) (*univariate test of significance*).

Effects	MS	F	p	Effects	MS	F	p
pH				TSS			
Categoria	1,9237	93,16	0,000000	Categoria	17,617	45,451	0,000000
Mês	0,6464	31,30	0,000000	Mês	1,707	4,403	0,013267
C*M	0,2137	10,35	0,000011	C*M	4,097	10,570	0,000009
TA				TH			
Categoria	0,053317	30,5262	0,000000	Categoria	0,02124	127,6	0,000000
Mês	0,000868	0,4967	0,688012	Mês	0,00712	42,8	0,000000
C*M	0,001256	0,7188	0,638318	C*M	0,00200	12,0	0,000003

MS – Mean squares; F- F test; p – significance level

Anexo II

Tabela A2 – Efeito da categoria da amostra (C) e o mês de recolha das mesmas (M) nos valores médios de compostos fenólicos totais (CFT), de carotenoides totais (CTT), bem como, da atividade antioxidante (AOx) (*univariate test of significance*).

Effects	MS	F	p
CFT			
Categoria	5257,2	243,291	0,000000
Mês	537,4	24,872	0,000000
C*M	424,4	19,640	0,000000
CCT			
Categoria	375,040	136,6625	0,000000
Mês	78,250	28,5137	0,000000
C*M	22,614	8,2403	0,000066
AOx			
Categoria	2573,2	40,999	0,000000
Mês	396,1	6,311	0,002608
C*M	397,5	6,33	0,000426

MS – Mean squares; F- F test; p – significance level

Anexo III

Tabela A3 – Análise de componentes principais das 5 variáveis testadas (CCT, CFT, AOx, TA e TSS) nas amostras de subprodutos (A, B e C), com uma percentagem significativa da informação original acumulada do fator 1 e o fator 2 superior a 70% (*Factor Loadings*).

Variáveis	Fator 1
TSS	0,760635
TA	0,726827
AOx	0,881394
CFT	0,902159
CCT	0,371081

Anexo IV

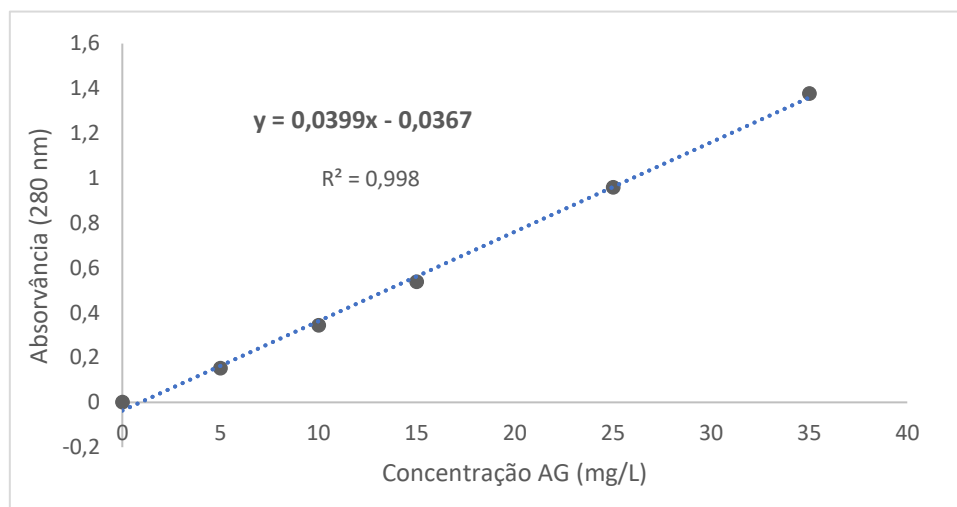


Figura A1 - Curva de calibração para quantificação dos compostos fenólicos totais utilizando o método direto

Anexo V

Tabela A4 - Desenho experimental da superfície de resposta

	Variáveis independentes		Variáveis dependentes	
	Fatores		Respostas	
	Proporção de etanol	Tempo de extração	CFT	TSS
	%	Min.	(mg/g)	°Brix
12 (C)	50_50	25	57,54	16,03
7	50_50	5	53,19	16,23
9 (C)	50_50	25	56,83	16,27
5	100_00	25	19,90	0,90
1	85_15	11	22,47	6,50
11 (C)	50_50	25	49,32	17,60
2	85_15	39	28,49	6,53
4	15_85	39	45,61	21,80
6	00_100	25	50,43	21,70
10 (C)	50_50	25	56,23	16,80
3	15_85	11	39,37	21,67
8	50_50	45	56,70	16,60